



Université de Sherbrooke

**Rôle de l'integrin-linked kinase dans la régulation des fonctions des  
cellules épithéliales de la crypte intestinale**

David Gagné

Département d'anatomie et biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en biologie cellulaire

2016

Jury:

Pr Jean-François Beaulieu, codirecteur

Pr Pierre H. Vachon, codirecteur

Pr Fernand-Pierre Gendron, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Pre Nathalie Fauchoux, Département de génie chimique et biotechnologique

Pre Nathalie Lamarche, Université McGill

## Résumé

L'*integrin-linked kinase* (ILK) est une protéine adaptatrice des points focaux d'adhésion (FAs) dont les fonctions contribuent à la régulation de plusieurs voies de signalisation cellulaire. L'ILK est également le constituant central du complexe tripartite PINCH-ILK-parvine (PIP ou IPP) qui est considéré comme une plateforme multidomaine importante pour l'échafaudage des FAs. Le complexe PIP est également impliqué dans la stabilisation mécanique de l'interface entre le domaine cytoplasmique des intégrines et le cytosquelette d'actine et il contribue à l'intégrité des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC). La dérégulation de l'expression ou de l'activité de l'ILK a de plus été rapportée chez différents types de cancers, incluant le cancer colorectal.

L'objectif de mes travaux de doctorat était de caractériser les fonctions de l'ILK dans l'épithélium de la muqueuse intestinale humaine normale. Nos travaux ont d'abord permis de mettre en évidence que l'ILK et les autres membres du complexe PIP sont détectés de façon prépondérante à la base des cellules épithéliales intestinales (CEIs) des cryptes de l'axe crypte-villosité humain, et en parallèle, dans les FAs des cellules prolifératives et indifférenciées des modèles de CEI humaine HIEC et Caco-2/15. Ensuite, l'utilisation d'un ARN interférent afin d'inhiber spécifiquement l'expression de l'ILK (siILK) a permis de démontrer que la réduction forcée de l'expression de l'ILK empêche la formation du complexe PIP chez les CEIs en culture. De plus, elle altère la prolifération, l'étalement et la migration chez les cellules HIEC, de même que la prolifération et le processus de restitution épithéliale chez les cellules Caco-2/15. Nos résultats indiquent également que la réduction forcée de l'expression de l'ILK entrave la capacité des cellules HIEC à assembler la fibronectine en MEC fibrillaire, de même que la capacité de ces cellules à développer les structures de l'axe intégrine-actine (p. ex. FAs de type tardif, fibres de stress ventrales parallèles) qui sont habituellement associées à l'acquisition du phénotype cellulaire contractile. Toutefois, l'adhésion sur un substrat de fibronectine exogène en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK suffit pour secourir l'essentiel des altérations aux fonctions des cellules HIEC et Caco-2/15, mais également pour rétablir la fibrillogénèse de la fibronectine, l'activité de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC et le phénotype contractile chez les cellules HIEC. Dans l'ensemble, ces données indiquent que la contribution principale de l'ILK dans l'élaboration du phénotype contractile des cellules HIEC et la régulation des fonctions des CEIs en culture résulte des effets fibronectine-dépendants du rôle du complexe PIP dans le processus de fibrillogénèse de la fibronectine. Nos données suggèrent que ce rôle du complexe PIP concerne spécifiquement les étapes du processus de fibrillogénèse permettant aux intégrines des CEIs en culture d'amorcer l'assemblage de la forme compacte et soluble de la fibronectine. Finalement, la corrélation entre la distribution prépondérante de l'ILK et ses partenaires du complexe PIP à la base des CEIs cryptales de l'axe crypte-villosité humain et celles de la fibronectine dans la lame basale sous-jacente propose que le complexe PIP possède un rôle équivalent envers la fibronectine chez les CEIs *in vivo* et donc que ce rôle soit important pour l'intégrité des interactions cellules-MEC/fibronectine régulant les fonctions et comportements des CEIs de la crypte intestinale humaine.

Mots-clés : ILK, complexe PINCH-ILK-parvine, matrice extracellulaire, intégrine, actine, cellule épithéliale intestinale, fibronectine, fibrillogénèse, Rho GTPases

# Table des matières

Résumé .....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	x
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 L'axe fonctionnel matrice extracellulaire-intégrine-actine</i>	
1.1.1 La matrice extracellulaire.....	1
1.1.2 Les intégrines.....	4
1.1.3 Interactions du domaine cytoplasmique des intégrines.....	7
1.1.4 Régulation mécanodépendante des interactions cytoplasmiques des intégrines...	9
1.1.5 L'integrin-linked kinase.....	10
1.1.6 Le cytosquelette d'actine.....	17
1.1.7 Les Rho GTPases.....	21
1.1.8 Rôle des Rho GTPases dans la régulation de l'axe MEC-intégrine-actine.....	24
1.1.9 Principales étapes de l'élaboration des FXs et des FAs.....	26
1.1.10 Formation des FBs et fibrillogénèse de la fibronectine.....	27
<i>1.2 La muqueuse intestinale</i>	
1.2.1 Constitution générale de l'intestin.....	29
1.2.2 L'épithélium intestinal et l'axe crypte-villosité.....	30
1.2.3 Expressions et fonctions des intégrines chez les CEIs .....	33
1.3 Hypothèse(s) et objectifs .....	35
<b>2. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>36</b>
2.1 Cultures cellulaires	
2.1.1 Cellules HIEC-6.....	36
2.1.2 Cellules Caco-2/15.....	36



2.2	<i>Transfection et transduction cellulaire</i>	
2.2.1	<i>Transfection des ARN interférents</i>	37
2.2.2	<i>Transduction du vecteur d'expression V5-tagged wtILK</i>	37
2.3	<i>Analyse de protéines par immunobuvardage de type western</i>	
2.3.1	<i>Préparation des extraits protéiques</i>	38
2.3.2	<i>Séparation des protéines et transfert sur membrane</i>	38
2.3.3	<i>Détection des protéines</i>	39
2.4	<i>Isolation et analyse de la matrice extracellulaire</i>	
2.4.1	<i>Récupération des protéines totales de la MEC des cellules en culture</i>	39
2.4.2	<i>Récupération de la matrice de fibronectine fibrillaire avec le deoxycholate</i>	40
2.4.3	<i>Recouvrement des pétris et des lamelles de verre par des protéines exogènes</i>	40
2.5	<i>Immunoprécipitation</i>	41
2.6	<i>Isolation des protéines et des Rho GTPases membranaires</i>	41
2.7	<i>Microscopie</i>	
2.7.1	<i>Microscopie optique</i>	42
2.7.2	<i>Microscopie par immunofluorescence indirecte sur des tissus intestinaux</i>	42
2.7.3	<i>Spécimens de tissu intestinal humain</i>	43
2.7.4	<i>Microscopie par immunofluorescence indirecte sur des cellules</i>	43
2.8	<i>Essai de prolifération cellulaire par incorporation du BrdU</i>	44
2.9	<i>Essais de migration cellulaire</i>	
2.9.1	<i>Essai de migration par la formation d'une blessure</i>	44
2.9.2	<i>Essai d'étalement/migration des agrégats cellulaires</i>	45
2.9.3	<i>Essai de restitution cellulaire</i>	46
2.10	<i>Essai Luciférase</i>	46
2.11	<i>Réaction en chaîne par polymérase et quantification PCR en temps réel</i>	
2.11.1	<i>Réaction d'ARN et transcription inverse (RT)</i>	47
2.11.2	<i>Réactions en chaîne par polymérase (PCR)</i>	48
2.11.3	<i>Quantification PCR en temps réel (qPCR)</i>	48

### 3. Résultats ..... 53

#### 3.1 *Caractérisation de l'expression de l'ILK chez les CEIs humaines*

3.1.1 *Expression et distribution des membres du complexe PIP chez les CEIs de l'axe crypte-villosité humain..... 53*

3.1.2 *Caractérisation des membres du complexe PIP chez les modèles cellulaires HIEC et Caco-2/15..... 57*

#### 3.2 *Analyse des fonctions de l'ILK chez les CEIs en culture*

3.2.1 *Caractérisation des paramètres d'utilisation et des effets d'un ARN interférent ciblant l'ILK chez les cellules HIEC et Caco-2/15..... 69*

3.2.2 *L'expression de l'ILK contribue à induire l'expression de la fibronectine et le processus de déposition/assemblage de cette dernière chez les cellules HIEC..... 75*

3.2.3 *La contribution principale de l'ILK dans les fonctions des CEIs en culture est médiée par son rôle dans la déposition de la fibronectine endogène ..... 78*

3.2.4 *L'ILK stimule la prolifération des CEIs en culture essentiellement par le biais de son rôle crucial dans la déposition de la fibronectine endogène..... 83*

3.2.5 *Les effets de l'inhibition exogène de l'expression de l'ILK n'altèrent pas l'expression des marqueurs de différenciation chez les cellules Caco-2/15..... 88*

#### 3.3 *Caractérisation des fonctions de l'ILK dans la dynamique structurale et fonctionnelle de l'axe MEC-intégrine-actine des CEIs indifférenciées ..... 90*

3.3.1 *L'expression de l'ILK permet le développement du phénotype cellulaire contractile chez les cellules HIEC ..... 90*

3.3.2 *Le rôle de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine stimule l'élaboration RhoA-dépendante des fibres de stress ventrales et des FAs matures chez les cellules HIEC ..... 100*

3.3.3 *Exploration des voies de signalisation impliquées dans le développement des fibres de stress ventrales et du phénotype contractile chez les cellules HIEC..... 115*

3.3.4 *Les fonctions de l'ILK sont facultatives afin que la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la tensine localisent dans les sites d'initiation de l'assemblage de la fibronectine ..... 123*

<b>4. Discussion.....</b>	<b>137</b>
4.1 <i>Paramètres de l'expression de l'ILK et du complexe PIP chez les CEIs en culture.....</i>	137
4.2 <i>Rôle de l'expression et de l'adhésion sur la fibronectine dans le contrôle des niveaux cellulaires et de la distribution de l'ILK chez les CEIs en culture .....</i>	141
4.3 <i>Le rôle de l'ILK dans l'assemblage de la forme soluble de la fibronectine endogène concerne spécifiquement les étapes permettant d'initier le processus de fibrillogénèse</i>	145
4.4 <i>Proposition de mécanismes généraux par lesquels l'ILK pourrait réguler les interactions fonctionnelles entre l'intégrine <math>\alpha 5 \beta 1</math> et la fibronectine .....</i>	151
4.5 <i>L'ILK régule l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC indirectement par les effets stimulants de la fibronectine sur la voie RhoA/ROCK.....</i>	154
4.6 <i>L'influence principale de l'ILK sur les fonctions des CEIs en culture dépend de son rôle pour la fibrillogénèse de la fibronectine.....</i>	160
4.7 <i>L'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine permet aux CEIs d'assembler et déposer la matrice de fibronectine fibrillaire dans la lame basale de la muqueuse intestinale.....</i>	165
4.8 <i>L'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine peut participer par différents mécanismes au contrôle du comportement des CEIs in vivo.....</i>	167
<b>5. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>171</b>
<b>6. Remerciements.....</b>	<b>173</b>
<b>7. Références.....</b>	<b>175</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires.....	50/51
Tableau 2 : Liste des amorces sens et anti-sens utilisées lors des PCR .....	52
Tableau 3 : Liste des inhibiteurs pharmacologiques.....	52

## Liste des figures

Figure 1 : Hétérodimères $\alpha\beta$ des intégrines.....	5
Figure 2 : Intéactome de l'ILK .....	14
Figure 3 : Les fibres de stress d'actine.....	20
Figure 4 : Principaux rôles des Rho GTPases pour le cytosquelette d'actine.....	22
Figure 5 : La muqueuse intestinale.....	32
Figure 6 : Expression et distribution de l'ILK chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine.....	54
Figure 7 : Distribution de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine et de la $\beta$ -parvine chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine.....	56
Figure 8 : Expression de l'ILK, PINCH-1 et des parvines chez les cellules HIEC et Caco-2/15.....	58
Figure 9 : Caractérisation des structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC.....	62
Figure 10: Caractérisation de la distribution des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC.....	63
Figure 11: Les membres du complexe PIP sont codistribués avec les structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC .....	64
Figure 12: Caractérisation de la distribution de l'ILK chez les cellules Caco-2/15 .....	66
Figure 13 : Caractérisation des paramètres de l'inhibition artificielle de l'expression de l'ILK par un ARN interférent spécifique chez les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15.....	70
Figure 14 : Détection des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC siILK et Caco-2/15 siILK .....	76

Figure 15 : L'inhibition de l'expression de l'ILK affecte l'expression et la déposition de la fibronectine chez les cellules HIEC.....	76
Figure 16 : L'ILK contribue au processus d'adhésion/étalement des cellules HIEC de façon indirecte par son rôle dans la déposition de la fibronectine endogène.....	79
Figure 17 : L'ILK contribue aux processus de migration des cellules HIEC de façon indirecte par son rôle dans la déposition de la fibronectine endogène .....	82
Figure 18 : L'inhibition forcée de l'expression de l'ILK ralentit le processus de restitution épithéliale des monocouches de cellules Caco-2/15.....	84
Figure 19 : Les fonctions de l'ILK dans la prolifération des CEIs indifférenciées dépendent principalement des effets de la fibronectine.....	86
Figure 20 : L'inhibition exogène de l'expression de l'ILK n'altère pas l'expression de marqueurs de différenciation chez les cellules Caco-2/15 .....	89
Figure 21 : L'inhibition de l'expression de l'ILK bloque l'élaboration du phénotype contractile chez les cellules HIEC .....	91
Figure 22 : L'inhibition de l'expression de l'ILK altère l'organisation des structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC en migration.....	94
Figure 23 : L'inhibition de ROCK entrave le développement des FAs chez les cellules HIEC siCNS, mais n'empêche pas la formation des FAs chez les cellules HIEC siILK....	96
Figure 24 : Les fonctions de l'ILK dans le développement des fibres de stress ventrales des cellules HIEC dépendent des effets de la fibronectine sur la voie RhoA/ROCK ....	98
Figure 25 : Le rôle de l'ILK permettant le développement des fibres de stress ventrales peut être secouru par l'adhésion des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène .....	101
Figure 26 : L'adhésion des cellules HIEC sur la fibronectine exogène soutient l'activation de la voie RhoA/ROCK/ <sup>pS19</sup> MLC indépendamment de l'expression de l'ILK .....	104
Figure 27 : L'adhésion sur la fibronectine exogène induit la fibrillogénèse de la fibronectine indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC.....	107
Figure 28 : Le rôle de l'ILK dans l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire stabilise l'interface cellule/MEC et permet l'étalement des cellules HIEC.....	109/110
Figure 29 : L'organisation contractile du cytosquelette d'actine des cellules HIEC dépend de l'expression de l'ILK et de l'activité des SFK et est régulée par les kinases PI3-K, MEK et p38.....	117

Figure 30 : La fibronectine et les fonctions des SFK stimulent le développement des fibres de stress ventrales et du phénotype contractile indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC.....	120
Figure 31 : La fibronectine contribue à la régulation des kinases responsables de contrôler l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC.....	122
Figure 32 : L'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC entrave la fibrillogénèse de la fibronectine par des effets distincts de ceux de l'inhibition de ROCK.....	126
Figure 33 : Les fonctions de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine sont facultatives pour la colocalisation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et de la fibronectine chez les cellules HIEC...	128
Figure 34 : L'expression de l'ILK chez les cellules HIEC n'est pas essentielle afin que l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ présente le site de liaison à la séquence RGD de la fibronectine.....	131
Figure 35 : Les fonctions de l'ILK chez les cellules HIEC contribuent à l'intégrité des FBs, mais ne sont pas essentielles pour la formation de ce type de structure.....	133
Figure 36 : Les fonctions de l'ILK chez les cellules HIEC contribuent à l'intégrité structurale de la matrice de fibronectine fibrillaire exogène.....	135

## Liste des abréviations

Actine-F : Actine filamenteuse  
Actine-G : Actine globulaire  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AKT : Rac-alpha serine/threonineprotein kinase  
ARNm : ARN messenger  
Arp2/3 : Actin related protein 2/3  
BrdU : Bromodésoxyuridine  
BSA : Bovine serum albumine  
Caco-2 : Human colon carcinoma cell line  
Cdc42 : Cell division cycle 42 protein homolog  
CdGAP : Cdc42 GTPase activation protein  
CEACAM6 : Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6  
CH : Calponin homology domain  
CHIP : C-terminal of Hsp70 interacting protein  
CH-TOG : Colonic and hepatic tumor overexpressed gene protein  
DAAM1 : Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1  
Dock180 : Downstream of Crk with molecular weight of 180 kDa  
DPPIV : Dipeptidyl peptidase IV  
Dvl : Dishevelled  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFR : EGF Receptor  
ELMO : Engulfment and motility  
EMT : Transition épithélium-mésenchyme  
EphA1: Ephrin type-A receptor 1  
ERK : Extracellular signal-regulated kinases  
FAK : Focal adhesion kinase  
FA/FAs : Point (s) d'adhésion focal/focaux  
FB: Adhesion fibrillaire  
FBS : Fetal bovine serum  
FITC : Fluorescein isothiocyanate  
FN : Fibronectine  
FX/FXs : Complexe (s) focal/focaux  
GAP : GTPase activating proteins  
GDI : Guanine nucleotide dissociation inhibitor  
GDP : Guanosine 5'-diphosphate  
GEF : Guanine nucleotide exchange factor  
GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3  
GTP : Guanosine 5'-triphosphate  
HFF: Human foreskin fibroblast  
HIEC : Human intestinal epithelial cell  
Hsp-27 : Heat shock protein of 27 kDa  
Hsp-90 : Heat shock protein of 90 kDa  
CEI : Cellule épithéliale intestinale  
ILK : Integrin-linked kinase  
ICAM : Intercellular adhesion molecule  
ILKAP : ILK-associated serine/threonine phosphatase  
IQGAP1 : IQ motif containing GTPase activating protein 1  
kd : Kinase dead; wt : Wild type

kDa : Kilodalton  
 Lgr5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5  
 LIM : Lin-11, Isl-1, Mec-3 domain  
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
 MEC : Matrice extracellulaire  
 MEF : Mouse embryonic fibroblaste  
 MLC : Myosin light chain  
 MLCK : Myosin light chain kinase  
 Nck2 : Noncatalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2  
 N.R. : Surface d'adhésion non recouverte de fibronectine  
 OAS1 : 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1  
 p130Cas : Crk-associated substrate of 130 kDa  
 PBS : Solution saline de tampon phosphate  
 PAK : p21-associated kinase  
 PCR : Réaction en chaîne par polymérase  
 PH: Domaine homologue de la pleckstrine  
 PHSRN : Proline – histidine – sérine – arginine - asparagine  
 PI3-K : Phosphoinositide 3-kinase  
 PINCH : Particularly interesting new Cys-His protein  
 PIP : Complexe PINCH-ILK-parvine  
 PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate  
 $\alpha/\beta$ -PIX : PAK-interactive exchange factor  $\alpha$  et  $\beta$   
 PKC : Protéine kinase C  
 PKL : Paxillin kinase linker  
 PP1 $\alpha$  : Protéine phosphatase 1 $\alpha$ ; PP2A : Protéine phosphatase 2A  
 qPCR : Quantification PCR en temps réel  
 Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 Ras : Rat sarcoma viral oncogene homolog  
 RCPG : Récepteur couplé aux protéines G  
 RGD : Arginine - Glycine – Aspartate  
 RhoA : Ras homolog gene family, member A  
 ROCK : Rho-associated coiled-coil containing protein kinase  
 Rsl1 : Ras suppressor protein 1  
 RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase  
 RT-PCR : Reverse Transcriptase– PCR  
 S/Ser : Sérine; T/Thr : Thréonine  
 SDS : Sodium dodecyl sulfate  
 (c-) Src : Cellular Rous sarcoma virus homolog  
 siRNA : Small interfering RNA  
 siCNS : siRNA contrôle non silencieux; siILK siRNA ciblant l'expression de l'ILK  
 SFK : Kinases de la famille Src  
 Shc : Src and collagen homology  
 TACC3 : Transforming acidic coiled coil-containing protein 3  
 TCF : T-cell factor  
 TESK1 : Testicular protein kinase 1  
 TRITC : Tetramethyl rhodamine isothiocyanate  
 uPAR : Urokinase-type plasminogen activator receptor  
 WASP : Wiskott-Aldrich syndrome Protein  
 WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein  
 Wnt : Wingless-type MMTV integration site family member



# Introduction

La dérégulation de l'expression ou de l'activité de l'integrin-linked kinase (ILK) chez les cellules épithéliales intestinales (CEIs) a précédemment été associée avec des processus tels que la transition épithélium-mésenchyme et la progression du cancer colorectal (Bravou et al., 2006; Delcommenne et al., 1998; Huang et al., 2007; Marotta et al., 2003; Novak et al., 1998; Tan et al., 2001; Troussard et al., 1999). Cependant, les fonctions de l'ILK dans l'épithélium de la muqueuse intestinale humaine saine n'ont jamais été formellement étudiées. Mon projet de doctorat avait pour objectif de déterminer la ou les principales fonctions de l'ILK chez les CEIs normales, mais également à identifier le ou les mécanismes impliqués dans ces fonctions potentielles. L'introduction qui suit vise donc à introduire les concepts de biologie cellulaire et les informations pertinentes concernant l'ILK et l'épithélium de la muqueuse intestinale, et ce, afin de faciliter la compréhension des travaux effectués et des résultats obtenus durant ce projet.

## *1.1 L'axe fonctionnel matrice extracellulaire-intégrine-actine*

### *1.1.1 La matrice extracellulaire*

Le terme matrice extracellulaire (MEC) désigne les assemblages spécialisés de macromolécules extracellulaires qui sont synthétisées, déposées et remodelées par les cellules dans les différents tissus de l'organisme (Marieb, 1993; Vakonakis and Campbell, 2007). Chez les mammifères, plus de 300 types de protéines, 200 types de glycoprotéines et 30 types de protéoglycanes différents peuvent être intégrés dans la MEC (Hynes and Naba, 2012). C'est donc la constitution et l'organisation spatio-temporelle spécifique de ce type de matériel biologique qui en détermine les propriétés structurales, biochimiques et biomécaniques.

De façon générale, la majeure partie de l'espace occupé par la MEC dans les tissus conjonctifs est rempli par la substance fondamentale. Ce type particulier de MEC forme un gel hydraté riche en glycoaminoglycanes (p. ex. N-acetylglucosamine, acide hyaluronique), en protéoglycanes (p. ex. décorine, syndécan) et en réseaux de protéines fibrillaires (p. ex. fibronectine, collagène I/III). Ce gel s'interpose physiquement entre les cellules (p. ex. cellules de types fibroblastiques) et les structures des tissus conjonctifs, tout en permettant aux

nutriments et autres facteurs solubles (p. ex. hormones et facteurs de croissance) de diffuser en milieu aqueux. L'axe vertical de la MEC des tissus conjonctifs lâches spécialisés de type *lamina propria* des muqueuses de l'organisme (p. ex. la *lamina propria* de la muqueuse intestinale) comprend habituellement deux compartiments distincts et juxtaposés qui sont ancrés physiquement l'un à l'autre. Il y a d'abord la matrice interstitielle dont la composition se rapproche de celle de la substance fondamentale et qui détermine les propriétés structurales et biomécaniques des muqueuses (Beaulieu, 1997; Powell et al., 2011). Puis, il y a la lame basale qui est un mince feuillet spécialisé de la MEC superposé à la matrice interstitielle et qui forme l'interface entre la *lamina propria* et le pôle membranaire basal des cellules épithéliales (Beaulieu, 1997; Kruegel and Miosge, 2010). Il a notamment été démontré que les différentes macromolécules formant la lame basale de la muqueuse intestinale sont exprimées soit par les cellules épithéliales uniquement (p.ex. sulfate d'héparane), soit par les cellules de la *lamina propria* telles que les myofibroblastes sous-épithéliaux (p. ex. collagène IV, ténascine) ou encore conjointement par les cellules de ces deux compartiments (p. ex. fibronectine, laminines) (Beaulieu, 1997). De plus, ces mêmes macromolécules peuvent être associées exclusivement à la lame basale épithéliale (constituants exclusifs, p. ex. laminines, collagène IV) ou associées simultanément à la lame basale et à la matrice interstitielle (constituants non exclusifs, p. ex. fibronectine, collagène VI et ténascine).

La modulation spatio-temporelle des interactions cellule-MEC dans un tissu particulier constitue l'un des principaux pivots — à la fois instructifs et permissifs — renseignant les cellules sur le répertoire des activités (p. ex. profil d'expression génomique) et comportements (p. ex. survie, prolifération, migration, différenciation) qu'elles doivent exécuter afin d'assurer le développement, le renouvellement et les fonctions spécifiques de ce tissu (Beaulieu, 1997; Labat-Robert, 2011; Reinhart-King, 2011). Par exemple, en plus des propriétés structurales de la matrice interstitielle qui sont importantes pour l'architecture des épithéliums, il est généralement reconnu que l'adhésion des cellules épithéliales sur la fibronectine et le collagène (p. ex. collagène IV et VII) de la lame basale stimulent la prolifération et la migration, alors que l'adhésion sur les laminines favorise la polarisation basale/apicale et la différenciation épithéliale (Beaulieu, 1997; Gilcrease, 2007; Kruegel and Miosge, 2010; Schwartz, 2010).

La fibronectine est une protéine structurale abondante de la MEC qui s'est avérée particulièrement importante pour mes travaux chez les cellules épithéliales intestinales (CEIs).

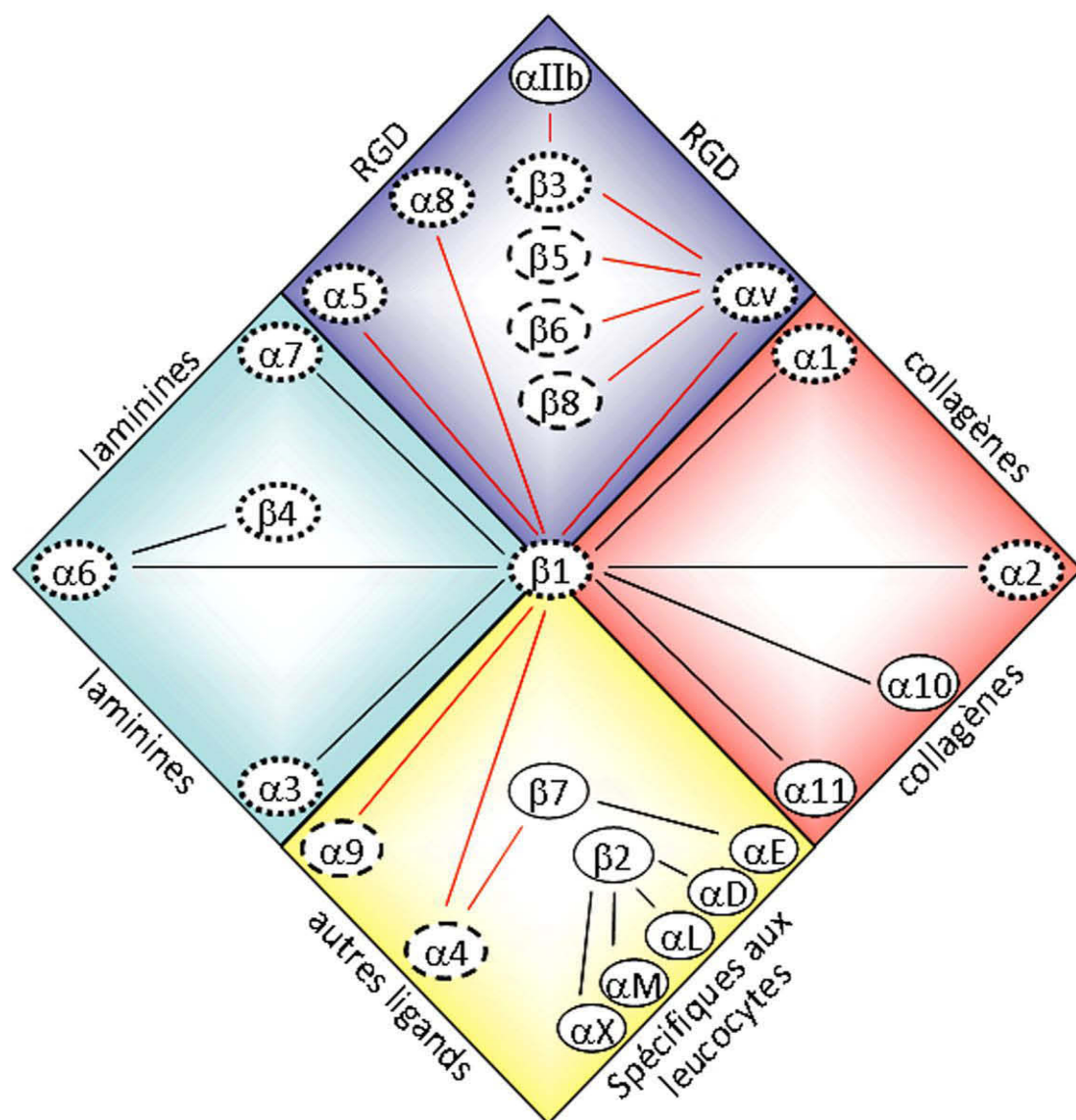
Cette glycoprotéine est constituée de plusieurs modules globulaires de type feuillet  $\beta$  désignés comme les domaines fibronectines de type I (FNI de 1 à 12), de type II (FNII 1 et 2) et de type III (FNIII de 1 à 15), ainsi que par trois autres domaines désignés modules extra « A » (EIIIA), « B » (EIIIB) et région variable « V » (V) (Singh et al., 2010). Les modifications dans l'expression de ces domaines par l'épissage alternatif du gène unique de la fibronectine génèrent une vingtaine d'isoformes différentes de cette dernière chez l'humain (Kornblihtt et al., 1996; Leiss et al., 2008). Deux types majeurs de fibronectine peuvent être exprimés par les cellules, soit d'une part la fibronectine plasmatique qui est libérée sous une forme compacte et soluble dans la circulation sanguine par les hépatocytes (Maurer et al., 2010; Singh et al., 2010). Ce type particulier de fibronectine sert principalement à la formation des thrombus sanguins avec le fibrinogène (Wang et al., 2014), mais peut également être assemblée dans la MEC des tissus (Moretti et al., 2007). Puis, il y a la fibronectine cellulaire qui est exprimée sous une forme compacte et soluble et assemblée en MEC fibrillaire par différents types cellulaires (p. ex. cellules épithéliales et fibroblastiques) (Hocking et al., 2000; Schwartz, 2010). L'assemblage de la fibronectine en réseau fibrillaire est typiquement déterminant pour les propriétés biochimiques et biomécaniques (rigidité vs élasticité) de la MEC. Pour cette raison, le processus de fibrillogénèse de la fibronectine (ce processus sera décrit en détail à la section 1.1.10) est crucial pour la régulation des nombreux processus cellulaires impliqués dans le développement, le maintien et la réparation des tissus (Glukhova and Thiery, 1993; Schwarzbauer and DeSimone, 2011). Dans la muqueuse intestinale normale des mammifères par exemple, la fibronectine est principalement détectée dans la MEC de la *lamina propria* du compartiment cryptal, mais également dans la lame basale supportant l'adhésion et les fonctions des CEIs prolifératives de ce compartiment (Beaulieu, 1992; Gagne et al., 2010; Quaroni et al., 1978). À l'inverse, l'assemblage aberrant de la fibronectine fibrillaire lors de certaines affections pathologiques telles que le cancer colorectal peut être associé à une vascularisation anormale et la formation de lésions fibreuses (Inufusa et al., 1995; Theocharis et al., 2015; To and Midwood, 2011).





### 1.1.2 Les intégrines

Les intégrines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires agissant en tant que principaux récepteurs cellulaires pour les protéines de la MEC (Hynes, 2002). Chacune des intégrines forme un hétérodimère composé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  liées de façon non covalente. Structurellement, la « tête » des intégrines constituée par la demi N-terminale extracellulaire des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  est supportée par les deux « jambes » des intégrines (une pour chaque sous-unité). La tête et les jambes forment ensemble la plus grande portion des intégrines et les jambes sont ancrées dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire d'environ 30 acides aminés. Les intégrines possèdent également un court domaine cytoplasmique ( $\cong$  50 acides aminés, à l'exception de la sous-unité  $\beta 4 \cong$  1000 acides aminés) sur lequel se trouve l'essentiel des sites d'interactions permettant l'élaboration d'un lien physique et fonctionnel entre les intégrines et le réseau de filaments d'actine (Gardel et al., 2010). Toutefois, c'est la tête de chacun des hétérodimères qui permet la liaison au ligand extracellulaire (Barczyk et al., 2010). Dans ce cas, la capacité d'une intégrine particulière à reconnaître certains ligands d'une même famille plutôt que d'autres dépend principalement de l'organisation et de la composition précise des domaines peptidiques spécifiques (p. ex. les domaines  $\alpha I/A$  et  $\beta I/A$  des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement) composant sa tête (Barczyk et al., 2010; Gahmberg et al., 2009). Cette spécificité des intégrines pour leurs ligands permet d'ailleurs de classer les 24 hétérodimères identifiés chez les mammifères en quatre groupes principaux (Barczyk et al., 2010; Hynes, 2002) (Figure 1) : un premier pour les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$  et  $\alpha IIb\beta 3$  qui reconnaissent la séquence peptidique Arg-Gly-Asp (RGD) présente dans certaines protéines de la MEC (p. ex. fibronectine, fibrinogène, ténectine, vitronectine); un deuxième pour les intégrines  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  et  $\alpha 7\beta 1$  qui reconnaissent différents sites d'interactions présents chez les protéines de la famille des laminines (p. ex. le domaine LG1-3 en C-terminal); un troisième pour les intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  et  $\alpha 11\beta 1$  capables de lier la séquence peptidique Gly-Phe-hydroxyPro-Gly-Glu-Arg (GFOGER) exprimée dans certains membres des collagènes (p. ex. collagène I, II, IV, VI et IX); un dernier pour les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha D\beta 2$ ,  $\alpha E\beta 7$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$  qui sont presque exclusivement exprimées chez les leucocytes et qui reconnaissent une variété de ligands cellulaires (p. ex. Intercellular adhesion molecule (ICAM) -1, -2, -3, -5, E-cadherine).

Figure 1: Hétérodimères  $\alpha\beta$  des intégrines

Classification schématique des 24 hétérodimères  $\alpha\beta$  des intégrines selon leurs ligands principaux, soit : 1) la séquence peptidique RGD de certains constituants de la MEC telles que la fibronectine et la vitronectine (RGD, section bleu foncée), 2) les membres de la famille des laminines (laminines, section bleu turquoise), 3) la séquence peptidique Gly-Phe-hydroxyPro-Gly-Glu-Arg (GFOGER) retrouvée chez certains membres de la famille des collagènes (collagènes, section rouge) et 4), les intégrines se liant à d'autres ligands et qui sont exprimées principalement par les leucocytes (autres ligands, section jaune). Les sous-unités exprimées par les CEIs de l'axe crypte-villosité dans un contexte cellulaire normal et les sous-unités exprimées par les CEIs dans des contextes cellulaires particuliers (p. ex. développement, cultures cellulaires, pathologies) sont identifiées par différents types de pointillés sur la figure (Beaulieu, 2010; Lussier et al., 2000; Stutzmann et al., 2000). [Schéma original, © D. Gagné, 2016, d'après les figures de Hynes (2002) et Barczyk et coll. (2010)]



-  —  : Hétérodimères pouvant lier un des domaines de la fibronectine  
 : Sous-unités exprimées par les CEIs de l'axe crypte-villosité de l'intestin adulte  
 : Sous-unités exprimées par les CEIs lors du développement ou de pathologies

**Figure 1**

Comme pour les constituants de la MEC, l'expression des intégrines peut-être régulée de façon spatio-temporelle chez les cellules des différents tissus de l'organisme (Beaulieu, 1997; Lussier et al., 2000). De plus, l'activité des intégrines n'est pas constitutive et il est généralement considéré que les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des hétérodimères s'assemblent dans le réticulum endoplasmique et conservent ensuite une conformation repliée inactive jusqu'à leur activation dans la membrane plasmique (Tiwari et al., 2011). Deux grandes catégories de mécanismes permettent de réguler l'activité et les fonctions des intégrines au niveau de la membrane plasmique. Il y a d'abord les mécanismes de type *outside-in* qui sont stimulés par les interactions entre les intégrines et leurs ligands extracellulaires. Puis, il y a les mécanismes de type *inside-out* qui contrôlent l'affinité et l'avidité des intégrines pour ces mêmes ligands grâce aux interactions et la modulation de la conformation de leur domaine cytoplasmique (Campbell and Humphries, 2011; Carman and Springer, 2003; Ginsberg, 2014). Le modèle le plus accepté de type *inside-out* est le modèle *switchblade* qui propose trois conformations différentes des intégrines, soit « repliée » (*bent*), « allongée » (*extended*) et « allongée tête ouverte » (*extended with an open headpiece*) correspondant respectivement aux états « inactif », « activé » et « lié/engagé » de ces récepteurs (Askari et al., 2009; Campbell and Humphries, 2011). Selon ce modèle, la conformation repliée limite la disponibilité de la plupart des sites d'interactions des domaines cytoplasmiques et extracellulaires des intégrines. La déformation intrinsèque variable de cette conformation permet néanmoins le recrutement éventuel des protéines adaptatrices taline et kindline respectivement sur les motifs NPxY (proximal de la membrane) et NxxY (distal) de la queue cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des hétérodimères (Legate and Fassler, 2009; Morse et al., 2014; Moser et al., 2009). Ces interactions induisent la présentation d'autres sites d'interactions sur la queue cytoplasmique et permettent le déploiement de la portion extracellulaire des intégrines en conformation « allongée ». Dans cette conformation, les intégrines possèdent une grande affinité envers leurs ligands et sont en mesure d'engager l'échafaudage du lien physique entre leur domaine cytoplasmique et les microfilaments d'actine (Askari et al., 2009). Finalement, un dernier modèle de l'activation des intégrines nommé *deadbolt* suggère que l'ouverture et l'activation des intégrines se produisent suite aux interactions entre le ligand et la portion extracellulaire des intégrines (Xiong et al., 2003). Toutefois, la nécessité pour les intégrines d'être engagées ou non à un ligand pour se regrouper

agrégats (*clustering*) et intégrer les structures d'adhésion semble variable en fonction du type d'intégrine, ainsi que des modèles cellulaires étudiés (Askari et al., 2009; Luo et al., 2007).

### *1.1.3 Interactions du domaine cytoplasmique des intégrines*

Plusieurs des étapes du processus d'activation des intégrines sont contrôlées par des mécanismes actifs (p. ex. phosphorylation) qui sont eux-mêmes régulés par les voies de signalisation stimulées par les sites d'adhésion cellule-MEC et cellule-cellule préétablis et/ou d'autres types de récepteurs transmembranaires (p. ex. les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)) (Gasparski and Beningo, 2015; Ginsberg, 2014; Streuli and Akhtar, 2009; Winograd-Katz et al., 2014). Le court domaine cytoplasmique des intégrines possède essentiellement tous les sites d'interactions permettant d'élaborer et de réguler la dynamique structurale et fonctionnelle des principales structures d'adhésion de l'axe MEC-intégrine-actine, soit les complexes focaux (FXs), les points focaux d'adhésion (FAs) et les complexes d'adhésion fibrillaires (FBs) (Gardel et al., 2010; Geiger and Yamada, 2011). Legate et Fassler (2009) classent les protéines pouvant s'associer directement à l'une ou l'autre des différentes sous-unités  $\beta$  des intégrines en trois catégories fonctionnelles distinctes (Legate and Fassler, 2009). Les protéines adaptatrices structurales (p. ex. taline, tensine,  $\alpha$ -actinine) peuvent lier simultanément les intégrines et les microfilaments d'actine. Les protéines adaptatrices d'échafaudages (p. ex. kindline, paxilline, ILK, PINCH, parvine) procurent plusieurs sites de liaison protéine-protéine. Finalement, les protéines adaptatrices possédant des fonctions catalytiques (p. ex. FAK, Src) permettent d'amorcer et de moduler les cascades signalétiques régulant la dynamique des sites d'adhésion des intégrines (Legate and Fassler, 2009).

La plupart des interactions cytoplasmiques des intégrines sont médiées par trois motifs peptidiques distincts conservés sur l'extrémité C-terminale des différentes sous-unités  $\beta$  (à l'exception de  $\beta 4$  et  $\beta 8$ ) (Legate and Fassler, 2009). D'abord, il y a le motif His-Asp-Arg-Arg (HARR) qui est localisé à proximité du domaine transmembranaire de la sous-unité  $\beta$ . Pour les intégrines inactives en conformation repliée, ce motif est inhibé par un lien ionique entre le domaine cytoplasmique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . L'association de la taline avec la sous-unité  $\beta$  des intégrines permet de briser ce lien et d'initier l'échafaudage des FXs et des FAs en rendant le motif HARR des intégrines accessible à la paxilline, ainsi qu'aux protéines-tyrosine kinases



FAK et Fyn (Huveneers and Danen, 2009; Legate and Fassler, 2009; Legate et al., 2009). Ensuite, tel que nous l'avons abordé précédemment, les motifs NPxY et NxxY (où Y est un résidu tyrosine) de la sous-unité  $\beta$  servent de sites d'association directe pour les protéines adaptatrices des FAs contenant des domaines de liaison aux phosphotyrosines de type « PTB » (p. ex. taline, tensine, Kindline 2 et 3, Shc) (Legate and Fassler, 2009; Legate et al., 2009; Morse et al., 2014). L'association entre les motifs NPxY et NxxY des intégrines et les protéines adaptatrices dépend principalement de la phosphorylation des résidus tyrosines de ces motifs par les kinases de la famille Src (SFK; p. ex. Src, Fyn, Yes, Syk). Toutefois, l'affinité des motifs NPxY et NxxY pour leurs ligands spécifiques peut être modulée par le jeu de phosphorylation (par la protéine kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) et la kinase AKT) et de déphosphorylation (par les protéines phosphatases de la classe 2A (PP2A)) des résidus sérines (S) et thréonines (T) retrouvées entre ces deux motifs (p. ex. S785, T788 et T789 de  $\beta$ 1). L'affinité du motif NxxY est également modulée par les interactions locales entre le domaine PTB des protéines adaptatrices (p. ex. taline, tensine) et les phosphoinositides de la membrane plasmique tels que principalement le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Ce type particulier de phosphoinositide est synthétisé par les enzymes de la classe phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) associées aux sites d'adhésion des intégrines. L'activation de la PI3-K stimule également le recrutement membranaire des protéines adaptatrices possédant un domaine homologue de la pleckstrine (domaine PH) (p. ex. Kindline, DOK1, SOS1). Par exemple, le recrutement de la kindline-2 dans les FAs nécessite la participation du domaine PH de cette protéine et s'effectue en coopération avec le complexe PINCH-ILK-Parvine (Fukuda et al., 2014; Huet-Calderwood et al., 2014; Rognoni et al., 2016). Or, il a été suggéré que le recrutement de la kindline-2 dans les FAs de podocytes rénaux en culture induit les interactions optimales entre la taline, le domaine cytoplasmique des intégrines et les domaines membranaires riches en phosphoinositides (Qu et al., 2011). Ces interactions seraient ainsi essentielles pour l'activation des intégrines et l'assemblage de la MEC de fibronectine chez ces cellules, mais également chez d'autres types cellulaires (Qu et al., 2011; Rognoni et al., 2016). Finalement, la modulation de l'expression et/ou de l'activité des partenaires extracellulaires (p. ex. uPAR) et membranaires (p. ex. caveoline, syndécan, EGFR, récepteurs Eph) des intégrines régulent également la dynamique des interactions entre les constituants des sites d'adhésion cellule-MEC et les intégrines (Cabodi et al., 2010; Legate et al., 2009; Parton and Simons, 2007; Smith and Marshall, 2010).

#### *1.1.4 Régulation mécanodépendante des interactions cytoplasmiques des intégrines*

Les voies de mécanotransductions cellulaires permettent de convertir les informations provenant d'événements mécaniques en signaux biochimiques intégrés aux cascades signalétiques (Gasparski and Beningo, 2015; Moore et al., 2010). Par exemple, il est connu que les stress mécaniques qui sont appliqués sur les cellules par l'environnement (p. ex. déformation mécanique des cellules dans les tissus) contribuent à la régulation de l'activité de certaines protéines kinases (p. ex. FAK et Src) et GTPases (p. ex. Rho GTPase) via leurs effets sur la régulation mécanodépendante de l'axe MEC-intégrine-actine et des canaux ioniques (Lessey et al., 2012; Moore et al., 2010). Le développement de la tension isométrique au sein de l'axe MEC-intégrine-actine par le mouvement rétrograde des filaments d'actine dans les structures d'actomyosine contractile des fibres de stress (voir la section 1.1.6 pour plus de détails sur les filaments d'actine, l'actomyosine et les fibres de stress) permet également de modifier l'activité et la dynamique des interactions des éléments mécanosensibles qui sont directement ou indirectement associées au domaine cytoplasmique des intégrines. Par exemple, la tension appliquée sur les intégrines des FAs est essentielle afin que la taline expose ses nombreux sites d'interactions cryptiques pour la vinculine (et d'autres protéines) (del Rio et al., 2009; Hytonen and Wehrle-Haller, 2015) et afin que la protéine adaptatrice p130Cas soit étirée et présente les motifs YXXP qui sont ciblés par les kinases de la famille Src (Sawada et al., 2006). De plus, il a été suggéré que l'augmentation initiale de la tension appliquée par les filaments d'actine lors des étapes précoces de la formation des sites d'adhésion des intégrines contrôle l'orientation de la taline associée au motif NPLY (NPxY) de la sous-unité  $\beta 3$  des intégrines afin de lui permettre d'interagir avec un autre motif (EFxxF) des intégrines (Hytonen and Wehrle-Haller, 2015; Saltel et al., 2009). Ce mécanisme serait impliqué dans le recrutement initial de la paxilline sur le motif NPLY, et ce, afin de réguler l'étalement et les processus de mécanosensation cellulaires (Hytonen and Wehrle-Haller, 2015; Pinon et al., 2014). La paxilline ainsi recrutée serait elle-même impliquée dans l'engagement initial de la kinase FAK menant à la formation du complexe Src-FAK (Hytonen and Wehrle-Haller, 2015). Or, les travaux de Zaidel-Bar et coll. (2007) suggèrent que la régulation mécanodépendante du complexe FAK-Src serait déterminante pour la régulation du jeu de phosphorylation des résidus Y31 et Y118 de la paxilline servant au contrôle de l'assemblage et du démantèlement des FXs, FAs et FBs (Zaidel-Bar et al., 2007). En

terminant, soulignons que la permutation de la taline pour la tensine sur le domaine cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  lors de la ségrégation des FBs (voir la section 1.1.10 pour plus de détails sur le processus de formation des FBs) dépend des forces de tension élevée développée par les fibres de stress au sein de l'axe MEC-intégrine-actine (Katz et al., 2000; Rankin et al., 2013).

#### 1.1.5 L'intégrine-linked kinase

L'existence de l'*integrin-linked kinase* (ILK) a été rapportée pour la première fois en 1996 par une étude de Hannigan et coll. qui décrivait alors la découverte d'une sérine/thréonine kinase ubiquitaire s'associant au domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines et contribuant à la signalisation de type *outside-in* (Hannigan et al., 1996). Cependant, près d'une vingtaine d'années après la publication des travaux originaux de Hannigan et coll. (1996), le site d'interaction directe de l'ILK sur le domaine cytoplasmique des intégrines n'a toujours pas été formellement identifié et selon plusieurs évidences actuelles le domaine kinase putatif de l'ILK serait dépourvu de réelle capacité enzymatique (Fukuda et al., 2011). Néanmoins, il est maintenant bien établi que l'ILK agit principalement comme une protéine adaptatrice des structures d'adhésion de type FA et que ses fonctions contribuent à la régulation des principaux processus et comportement cellulaire (Qin and Wu, 2012; Widmaier et al., 2012).

L'ILK est une protéine de 452 acides aminés formée de trois domaines principaux soit : un domaine formé par cinq répétitions de type ankyrine formant son segment N-terminal, un domaine central de type pleckstrine homologue (PH) et finalement un domaine analogue au domaine kinase des protéines-sérine/thréonine kinases sur son segment C-terminal (Legate et al., 2006). Toutefois, certains travaux suggèrent que le domaine PH qui avait originalement été prédit pour être phosphorylé par la PI3-K serait au bout du compte non fonctionnel pour lier le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate et qu'il ferait partie intégrante du domaine kinase de l'ILK (Fukuda et al., 2009; Zhang et al., 2002). Qui plus est, comme nous l'avons mentionné la capacité enzymatique du domaine sérine/thréonine kinase de l'ILK demeure toujours un sujet de controverse. En effet, l'équipe du Dr S. Dedhar à l'origine de la découverte de l'ILK continue de soutenir l'authenticité de ce domaine (Hannigan et al., 2011; Maydan et al., 2010; Serrano et al., 2013). Cependant, le domaine kinase atypique de l'ILK ne possède pas certains des résidus

critiques des domaines sérine/thréonine kinases conventionnels (Lynch et al., 1999; Wickstrom et al., 2010b). De plus, de nombreuses études ont été incapables de démontrer que l'ILK est en mesure de phosphoryler directement ses substrats présumés (p.ex. AKT, GSK-3) ou la nécessité de ses fonctions enzymatiques putatives chez les invertébrés et les mammifères (Fukuda et al., 2009; Grashoff et al., 2003; Lange et al., 2009; Lynch et al., 1999; Mackinnon et al., 2002; Sakai et al., 2003b; Zervas et al., 2001). Dans un tel contexte, la majorité des revues de littérature récentes concernant l'ILK considère cette dernière comme une pseudokinase (Dagnino, 2011; Ghatak et al., 2013; Qin and Wu, 2012; Wickstrom et al., 2010b; Widmaier et al., 2012). Cette classe regroupe les protéines détenant un domaine kinase analogue à celui des kinases classiques, mais qui ne détiennent pas d'activité enzymatique intrinsèque (p. ex. Stradd, HER3, CASK) (Boudeau et al., 2006; Rajakulendran and Sicheri, 2010). Ainsi, les effets de l'expression des constructions « kinase inactive » utilisées dans plusieurs études en tant que dominants négatifs des fonctions kinases de l'ILK s'expliquent vraisemblablement par l'altération des interactions avec les partenaires habituelles de l'ILK type sauvage (Wickstrom et al., 2010b).

La translocation de l'ILK vers les intégrines des sites d'adhésion cellules-MEC dépend de la formation du complexe hétérotrimérique PINCH-ILK-parvine (complexe PIP ou IPP) (Boulter and Van Obberghen-Schilling, 2006; Zhang et al., 2002). Ce complexe se forme suite à l'association de PINCH-1 ou PINCH-2 sur le domaine de répétitions ankyrines de l'ILK et de l'un des trois membres des parvines ( $\alpha$ -parvine,  $\beta$ -parvine ou  $\gamma$ -parvine) sur le domaine sérine/thréonine kinase analogue de l'ILK (Chiswell et al., 2010; Wickstrom et al., 2010b). Les deux membres de la famille de protéines adaptatrices PINCH sont constitués de cinq domaines d'interactions protéine-protéine LIM, tandis que les trois membres des protéines adaptatrices parvines contiennent chacun une paire de domaines d'interactions de type *calponin homolog* (CH) (Kovalevich et al., 2011; Sepulveda and Wu, 2006). Chacun des membres des protéines PINCH et parvines est codé par un gène différent (Braun et al., 2003; Korenbaum et al., 2001; Sepulveda and Wu, 2006). L'expression de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine (également nommée CH-ILKBP et actopaxine) et de la  $\beta$ -parvine (également nommée affixine) est pratiquement constitutive chez les différents types cellulaires de mammifères. Celle de PINCH-2 est plus restreinte et celle de la  $\gamma$ -parvine est principalement détectée chez les cellules du système hématopoïétique. Ainsi, il est généralement considéré que les cellules de mammifères expriment plus d'un sous-type du complexe PIP (p. ex. P1-ILK- $\alpha$ P, P1-ILK- $\beta$ P, P2-ILK- $\alpha$ P, etc.) et que ces

sous-types peuvent être impliqués dans des fonctions cellulaires spécifiques et communes (Sepulveda and Wu, 2006; Shi et al., 2008).

Il est typiquement considéré que l'essentiel de la population cellulaire de l'ILK et des protéines PINCH et parvines participe au complexe PIP et que ce complexe permet de préserver ces protéines d'être dégradées par les voies du système ubiquitine-protéasome (Qin and Wu, 2012; Wickstrom et al., 2010b; Widmaier et al., 2012). Cependant, les travaux de Sandfort et coll. (2010) ont établi que le degré de corrélation entre les niveaux cellulaires des membres du complexe PIP chez les cellules en culture dépend avant tout du modèle cellulaire et que cette corrélation est généralement plus faible chez les lignées cellulaires cancéreuses (Sandfort et al., 2010). De plus, les mécanismes exacts permettant de réguler la formation, la stabilité et la localisation cellulaire de l'hétérotrimère PIP chez les cellules de mammifères demeurent toujours peu connus. Néanmoins, il a été démontré par différentes études que ces mécanismes peuvent être régulés par le *Transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) (Jung et al., 2007), qu'ils dépendent de l'activation des kinases de la famille PKC (Zhang et al., 2002) et qu'ils sont modulés par les kinases de la famille Src, PAK, AKT, PI3-K et ERK1 (Acconcia et al., 2007; Attwell et al., 2003; Camacho-Leal et al., 2007; Clarke et al., 2004; Delcommenne et al., 1998; Pignatelli et al., 2012; Yang et al., 2005; Zervas et al., 2011; Zhang et al., 2002). Il semble également que l'association entre l'ILK et les parvines soit régulée par le jeu de phosphorylations de ces protéines (Clarke et al., 2004; Fukuda et al., 2009; Nikolopoulos and Turner, 2002) et que la protéine chaperonne Hsp-90 stabilise l'association entre l'ILK et l' $\alpha$ -parvine afin de préserver l'ubiquitination de l'ILK par l'ubiquitine-ligase CHIP (Radovanac et al., 2013).

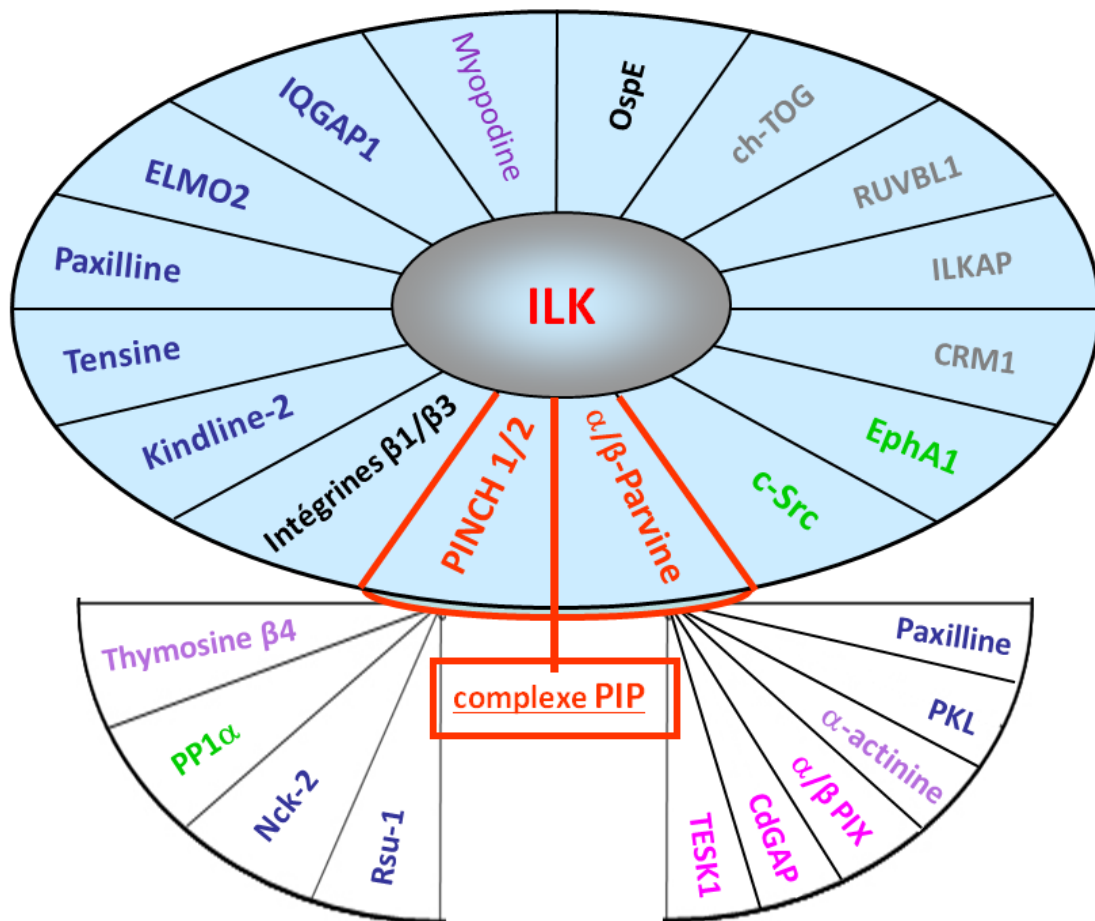
Par ailleurs, PINCH1/2 et l'ILK — qui possèdent respectivement une et deux séquences de localisation nucléaire — sont également rapportées pour localiser dans le nucléoplasme cellulaire (Kovalevich et al., 2011; Nakrieko et al., 2008a). Une étude par Acconcia et coll. (2007) révèle à ce sujet que le jeu des phosphorylations des résidus thréonine-173 et sérine-246 de l'ILK par la kinase PAK1 est important afin de réguler la localisation de l'ILK entre le nucléoplasme, le cytoplasme et les sites membranaires d'adhésion cellule-MEC du modèle cellulaire MCF-7 (Acconcia et al., 2007). Puis, une autre étude effectuée par Nakrieko et coll. (2008) indique que la translocation nucléo-cytoplasmique de l'ILK chez des cultures de kératinocytes indifférenciés dépend de 1) l'association entre l'ILK et la protéine de la famille des exportines CRM1 (Figure 2) et 2) de l'activité catalytique de la phosphatase de l'ILK nommée *integrin-linked*

*kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C* (ILKAP ; Figure 2) (Nakrieko et al., 2008a). L'ILK a également été identifiée dans le centrosome de certains modèles cellulaires cancéreux (p. ex. Hela) (Lim et al., 2013). Ces sous-populations centrosomiques de l'ILK sont distinctes de celles impliquant le complexe PIP et participeraient à la formation de deux autres complexes tripartites. Un premier avec l'hélicase de l'ADN *Ruvb-like 1* (RUVBL1) et avec l' $\alpha$ -tubuline (Figure 2) (Dobrev et al., 2008). Il a été suggéré que ce complexe soit impliqué dans le transport nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et qu'il contribuerait au maintien de l'intégrité structurale de l'enveloppe nucléaire. L'ILK forme un deuxième complexe centrosomique avec les protéines ch-TOG et TACC3 (Figure 2) (Fielding et al., 2011; Lim et al., 2013). Pour sa part, ce complexe a été identifié pour induire la phosphorylation de TACC3 par la kinase Aurora-A lors de la formation du fuseau mitotique chez les cellules cancéreuses et il a été suggéré qu'il pourrait avoir un rôle analogue durant la mitose des cellules normales (Fielding et al., 2008a; Fielding et al., 2011; Lim et al., 2013).

D'autre part, une étude phylogénétique des constituants des sites d'adhésion des intégrines par Sebe-Pedros et coll. (2010) révèle que les membres du complexe PIP sont exprimés chez tous les organismes métazoaires, de même que chez certains organismes eucaryotes inférieurs tels que ceux du règne des mycètes. D'après ces auteurs le complexe PIP serait l'un des premiers assemblages de protéines adaptatrices à s'être associé avec les intégrines au cours de l'évolution (Sebe-Pedros et al., 2010). Le complexe PIP agit comme un complexe d'échafaudage important des sites d'adhésion des intégrines et il peut s'associer avec une grande variété de partenaires via les interactions directes et indirectes de ses membres (Figure 2) (Qin and Wu, 2012). Parmi les partenaires du complexe PIP dans les FAs on retrouve : 1) des protéines adaptatrices et structurales (p. ex. paxilline, tensine, kindline, IQGAP1, Rsu-1), 2) des Rho GEF et GAP (p. ex. TESK1, cdGAP,  $\alpha/\beta$ -PIX), 3) des protéines pouvant s'associer à l'actine (p. ex. thymosine  $\beta$ 4,  $\alpha$ -actinine, myopodine) et 4) des protéines kinases (p. ex. c-Src) et phosphatases (p. ex. PP1 $\alpha$ ) (Qin and Wu, 2012; Widmaier et al., 2012). Les deux partenaires les plus notables du complexe PIP sont plausiblement la kindline (kindline-2) et la paxilline (Figure 2), puisque ces deux protéines adaptatrices sont importantes pour la régulation des fonctions des intégrines et l'échafaudage des FAs.

Figure 2: Intéractome de l'ILK et du complexe PIP

Schéma présentant les principales interactions de l'ILK et de ses partenaires PINCH1/2 et  $\alpha/\beta$ -parvine dans le complexe d'échafaudage PIP. Parmi les partenaires du complexe PIP dans les points focaux d'adhésion on retrouve les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 3$  des intégrines (en noir), des protéines adaptatrices et structurales (en bleu), des Rho GEF/GAP (en rose), des protéines associées à l'actine (en mauve) et des protéines kinases et phosphatases (en vert). On y retrouve également la protéine OspE (en noir) qui est exprimée par la bactérie pathogène de l'intestin *Shigella flexneri* et qui détourne les fonctions de l'ILK dans le but de renforcer l'adhésivité des CEIs infectées et d'empêcher leur élimination normale. La phosphatase ILKAP et l'exportine CRM1 (en gris) qui régulent la localisation nucléo-cytoplasmique de l'ILK, de même que les protéines ch-TOG et RUVBL1 (en gris) qui interagissent avec l'ILK (hors du complexe PIP) dans le centrosome sont également indiquées sur le schéma (Dobrev et al., 2008; Lim et al., 2013; Qin and Wu, 2012; Wickstrom et al., 2010; Widmaier et al., 2012). [Schéma original, © D. Gagné, 2016]



**Figure 2**



Les deux domaines CH des parvines sont impliqués dans les interactions de ces protéines avec l'ILK et la paxilline et forment ensemble un site de liaison pour les microfilaments d'actine (Fukuda et al., 2009; Lorenz et al., 2008; Sjoblom et al., 2008; Stiegler et al., 2012; Wang et al., 2008b). En ce sens, des travaux ayant étudié les fonctions de l'ILK et de ses partenaires chez les modèles génétiques du ver nématode (*C. elegans*) et de la mouche drosophile (*D. melanogaster*) ont démontré que l'expression de l'ILK est impliquée dans la stabilisation mécanique de l'interface entre le domaine cytoplasmique des intégrines et l'actine-F des cellules musculaires de ces organismes (Lin et al., 2003; Mackinnon et al., 2002; Norman et al., 2007; Zervas et al., 2001). Conformément à ces travaux, une fonction équivalente pour l'ILK a été identifiée lors des premières étapes du développement de la souris (cellules de l'épiblaste) (Sakai et al., 2003b) et pour le complexe PIP chez des fibroblastes embryonnaires de rein de ce même mammifère (Stanchi et al., 2009). Ainsi, il est maintenant généralement considéré que le complexe PIP est un constituant essentiel de la stabilité de l'interface intégrine/actine des FAs chez les cellules de mammifères et que cette fonction explique le rôle du complexe PIP dans la formation des FBs et l'assemblage de la fibronectine (Ghatak et al., 2013; Stanchi et al., 2009). Toutefois, ce rôle du complexe PIP pourrait ne pas être constitutif ou essentiel chez tous les types cellulaires des organismes supérieurs. En effet, plutôt qu'un détachement entre l'actine et les intégrines, c'est un détachement entre la membrane plasmique et la MEC qui est rapporté chez les cellules musculaires de deux modèles de vertébrés différents déficients pour l'expression de l'ILK, soit la souris et le poisson-zèbre (Postel et al., 2008; Wang et al., 2008a). De plus, une étude effectuée chez différents modèles cellulaires de mammifères (p. ex. CHO, HEK 293T et MEF) a récemment identifié que les interactions entre l'ILK (dans le complexe PIP) et la kindline-2 permettent l'activation de l'intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  (Huet-Calderwood et al., 2014). Or, il est bien établi dans la littérature que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  est la principale intégrine formant les FBs responsables de l'assemblage de la fibronectine fibrillaire (Singh et al., 2010). Considérant ces dernières informations, il est indiqué d'envisager qu'en plus des fonctions déjà établies du complexe PIP pour la stabilisation de l'interface intégrine-actine, d'autres fonctions de ce complexe pourraient également contribuer à la formation des FBs et à la fibrillogénèse de la fibronectine chez les cellules des vertébrés.

Dans le même ordre d'idée, il existe des observations contradictoires dans la littérature concernant les fonctions de l'ILK et/ou du complexe PIP dans la régulation des comportements

et fonctions cellulaires (p. ex. prolifération vs différenciation) (Dagnino, 2011; Eke et al., 2009). Par exemple, alors que l'expression de l'ILK et/ou de ses partenaires habituels chez des modèles de cellules endothéliales et de cellules fibroblastiques stimule l'activité contractile RhoA-dépendante et la maturation des structures de l'axe MEC-intégrine-actine (Graness et al., 2006; Stanchi et al., 2009; Vouret-Craviari et al., 2004), il est rapporté qu'à l'opposé cette expression inhibe ces mêmes processus chez des cultures primaires de cellules de Schwann et de cellules de muscle lisse vasculaire (Kogata et al., 2009; Pereira et al., 2009). Ces distinctions proposent donc que dans différents contextes ou chez différents types cellulaires, soit les mêmes fonctions de base du complexe PIP engagent des réponses cellulaires différentes ou soit le complexe PIP est impliqué pour des fonctions distinctes au sein de l'axe MEC-intégrines-actine. Évidemment, des variations dans le répertoire des interactions du complexe PIP avec ses nombreux partenaires dans les FAs peuvent plausiblement expliquer ces distinctions fonctionnelles concernant l'ILK et le complexe PIP d'un contexte ou d'un type cellulaire à l'autre (Widmaier et al., 2012).

Jusqu'à maintenant, les travaux concernant l'étude des fonctions de l'ILK dans l'épithélium intestinal et chez les modèles de CEIs ont principalement analysé les effets de la dérégulation de l'expression et des fonctions de l'ILK dans le contexte du cancer colorectal (CRC) et chez des modèles de CEIs anormales. Ainsi, différents travaux de recherches ont révélé que le développement des lésions précancéreuses et cancéreuses durant le CRC est corrélé avec la surexpression de l'ILK dans la muqueuse intestinale (Bravou et al., 2003; Bravou et al., 2006; Huang et al., 2007; Li et al., 2012; Marotta et al., 2003; Marotta et al., 2001). Similairement, il a été démontré que l'augmentation de l'expression de l'ILK durant le CRC et chez différents modèles cellulaires de CEI (p. ex. immortalisée de rat IEC-18 et d'origines cancéreuses SW480 et DLD-1) stimule le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) *in vivo* et *ex vivo* (Bravou et al., 2006; Huang et al., 2007; Tan et al., 2001). Ce contexte cellulaire cancéreux impliquant l'ILK stimule la phosphorylation des kinases AKT (sérine-473 ; activation) et GSK-3 (Sérine-9 ; inhibition), de même que l'activité transcriptionnelle promototique de la  $\beta$ -caténine (Bravou et al., 2006; Delcommenne et al., 1998; Huang et al., 2007; Marotta et al., 2003; Novak et al., 1998; Tan et al., 2001; Troussard et al., 1999). En parallèle, l'ILK est également rapportée pour coopérer avec la voie Wnt canonique (Oloumi et al., 2010; Oloumi et al., 2006) et cette voie est généralement considérée comme centrale dans la stimulation de la prolifération induite par la  $\beta$ -caténine nucléaire des CEIs normales et cancéreuses (Sancho et al., 2004). Ensuite, des études

de Assi et coll. (2008, 2011) rapportent que la délétion conditionnelle — mais incomplète (en mosaïque) — de l'ILK dans l'épithélium intestinal de souris induit une baisse de la prolifération et de l'expression de la fibronectine chez les CEIs de la muqueuse intestinale. La délétion de l'ILK dans ce contexte protège partiellement la muqueuse intestinale de ces souris contre les processus inflammatoires, la formation de lésions fibreuses et la transformation néoplasique de l'épithélium intestinal (Assi et al., 2008; Assi et al., 2011). Par ailleurs, les travaux de recherches de Kim et coll. (2008) indiquent que l'ILK s'associe directement avec Src chez les cellules de la lignée normale de Rat RIE- $\alpha$ 5. Dans ce cas, il semble que le complexe Src-ILK pourrait phosphoryler et inhiber directement la sérine 3 de la cofiline (<sup>S3</sup>cofiline) afin de réguler la dynamique de la polymérisation de l'actine-F pendant le processus d'adhésion/étalement de ces cellules sur la fibronectine exogène (Kim et al., 2008). Plusieurs autres études à caractère signalétique concernant l'ILK ont été réalisées chez des modèles de CEI (p. ex. IEC-6, IEC-18, HCT116 et Caco-2) (Delcommenne et al., 1998; Oneyama et al., 2012; Wang and Basson, 2009; Yuan et al., 2011). Il se dégage globalement de ces études que les kinases Src et PI3-K seraient importantes afin de réguler la distribution et les fonctions signalétiques de l'ILK. Cette dernière contribuerait à son tour à réguler la phosphorylation et l'activité des protéines kinases FAK, AKT, GSK-3. Considérant ces dernières informations sur l'expression et les fonctions de l'ILK durant le CRC et les modèles de CEIs cancéreuses ou anormales, il semble plus que probable que l'expression et les fonctions de l'ILK dans l'épithélium intestinal sain contribuent à la régulation des comportements et des fonctions des CEIs normales formant cet épithélium.

### *1.1.6 Le cytosquelette d'actine*

Le cytosquelette cellulaire est un assemblage complexe de différentes protéines cytoplasmiques formant trois réseaux distincts de filaments, soit : 1) le réseau de filaments d'actine (ou de microfilaments), 2) le réseau de filaments intermédiaires et 3) le réseau de microtubules (Alberti, 2009; Chang and Goldman, 2004; Goode et al., 2000). Ces trois réseaux confèrent aux cellules leurs propriétés biomécaniques et structurales. De plus, ils contribuent ensemble à l'organisation des organites, du contenu intracellulaire et des autres structures cellulaires.

L'actine est la protéine la plus abondante des cellules eucaryotes où elle forme deux populations cytoplasmiques interdépendantes, soit une population soluble de monomère d'actine

globulaire (actine-G) et une population d'actine filamenteuse (actine-F ou microfilaments). L'actine-F provient de l'assemblage des monomères d'actine-G en une double hélice polarisée (Campellone and Welch, 2010). Le contrôle de l'organisation architecturale (p. ex. de type cortical, orthogonal ou contractile) et fonctionnelle (p. ex. chez les cellules isolées en migration ou les cellules épithéliales polarisées formant une monocouche) du cytosquelette d'actine se fait en collaboration avec plus d'une centaine de protéines différentes (p. ex. profiline, cofiline,  $\alpha$ -actinine, Arp2/3, myosine II). Ce contrôle dépend également de nombreux processus tels que l'initiation de la polymérisation des nouveaux filaments, la polymérisation et la dépolymérisation de l'extrémité des filaments, ainsi que le cisaillement, l'embranchement et l'empaquetage des filaments existant en faisceaux (Campellone and Welch, 2010; Pollard and Cooper, 2009). Les différents types de faisceaux d'actine-F sont impliqués dans l'exécution de plusieurs processus cellulaires importants tels que l'adhésion cellule-MEC, l'adhésion cellule-cellule, l'étalement, la migration, la cytokinèse, le transport vésiculaire, l'assemblage de la MEC (Caswell et al., 2009; Collins and Nelson, 2015; Gardel et al., 2010).

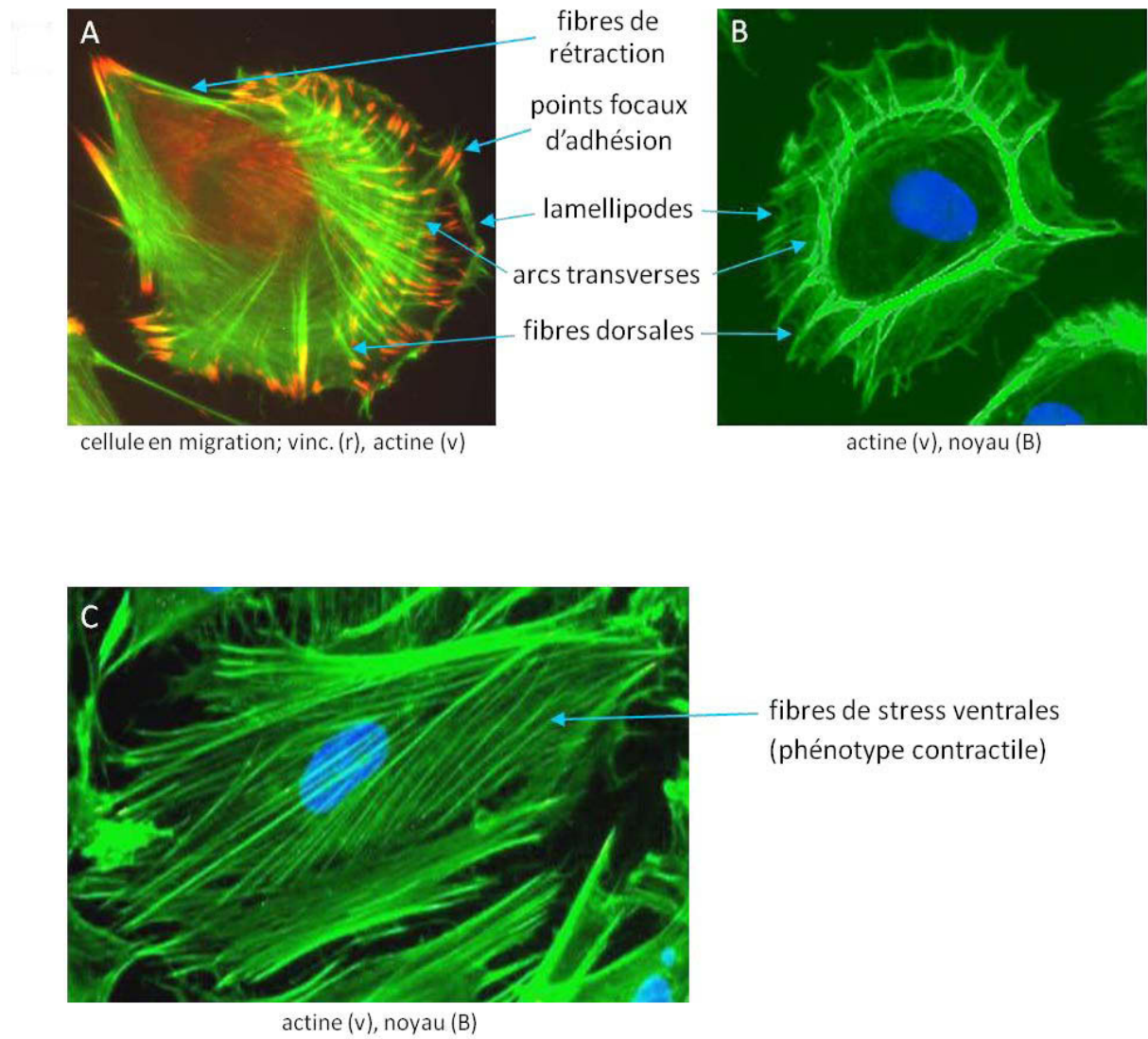
Chez les cellules de mammifères, la myosine II, l'actine-F et la tropomyosine forment des motifs d'alternances périodiques d'actomyosine dont l'organisation spécifique varie en fonction des trois principaux types de fibres de stress pouvant être formés, soit les fibres de stress dorsales, les arcs transverses et les fibres de stress ventrales (Burridge and Wittchen, 2013; Tojkander et al., 2012). De façon générale, les faisceaux formant les fibres de stress se composent de 10 à 30 microfilaments associés latéralement par des homodimères antiparallèles d' $\alpha$ -actinine et longitudinalement par la protéine multimérique myosine II (Kassianidou and Kumar, 2015). Cette dernière contient deux paires de sous-unités à activité ATPasique nommées chaîne légère de la myosine de 20 kDa (MLC) qui sont capables de convertir l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en mouvement contractile (Deguchi and Sato, 2009). Chez les cellules non musculaires cultivées sur un substrat d'adhésion (en culture 2D) suffisamment rigide, la stimulation de l'activité catalytique de la myosine II induit la formation des fibres de stress ventrales (Figure 3C). Soulignons dans ce cas que la rigidité du substrat d'adhésion est typiquement déterminée par le « module de Young », c.-à-d. le ratio entre la valeur de la force de traction requise pour déformer un matériau — tel que la MEC — et les effets de cette force sur la déformation élastique de ce dernier (Schwarz and Gardel, 2012). L'organisation périodique régulière des structures d'actomyosine des fibres de stress ventrales est similaire à la structure

sarcomérique des myofibrilles musculaires. Ce type d'organisation facilite la « marche » de la myosine II sur l'actine-F et le mouvement rétrograde contractile de cette dernière est responsable du développement de la tension isométrique au sein de l'axe MEC-intégrine-actine (Tojkander et al., 2012). Ainsi, la formation de longues fibres de stress ventrales parallèles à l'axe de polarisation longitudinale des cellules adhérentes est considérée comme un indicateur de forces de tension isométrique élevées, de même que du phénotype cellulaire contractile de type fibroblastique chez les cellules non musculaires (Figure 3C) (Burridge and Wittchen, 2013; Prager-Khoutorsky et al., 2011).

D'autre part, contrairement aux longues fibres de stress ventrales dont chaque extrémité est ancrée à un FA, les courtes fibres de stress dorsales non contractiles ont seulement une de leurs extrémités associées avec un FA (Figures 3A et 3B) (Naumanen et al., 2008). Les fibres de stress dorsales peuvent s'associer de façon orthogonale aux fibres de stress courbes de type arc transverse afin de former des réseaux d'actine orthogonaux au niveau de la membrane plasmique dorsale (Figures 3A et 3B) (Naumanen et al., 2008; Zemel et al., 2010). Dans ce cas, il est à noter que seuls les arcs transverses sont reconnus pour être intrinsèquement contractiles, les fibres de stress dorsales servant plutôt à transmettre les forces de tension vers les FAs en développement (Rognoni et al., 2016; Tojkander et al., 2012). Ce type d'organisation precontractile du cytosquelette d'actine est associé en culture 2D avec l'élaboration des lamellipodes (c.-à-d. les larges protrusions/extensions de la membrane plasmique périphérique) chez les cellules possédant une morphologie arrondie de type épithélioïde (Figures 3B) (Huveneers and Danen, 2009; Lawson and Burridge, 2014; Zemel et al., 2010). Chronologiquement, ce type d'organisation du cytosquelette d'actine précède l'élaboration de fibres de stress ventrales parallèles lors du processus d'étalement des types cellulaires qui développent un phénotype contractile (Figures 3C).

Figure 3: Les fibres de stress d'actine

Il existe trois principaux types de fibres de stress pouvant être formés chez les cellules en cultures à la surface des pétris, soit les fibres de stress dorsales, les arcs transverses et les fibres de stress ventrales. (A et B) Les fibres de stress de type dorsales et les arcs transverses s'associent habituellement en réseaux d'actine de type orthogonal, ce qui stimule l'élaboration de lamellipodes chez (A) les cellules en migration et (B) durant la phase isotropique de l'étalement cellulaire ou chez les cellules adoptant une morphologie arrondie de type épithélial. Dans ce type de réseau, les courtes fibres de stress dorsales non contractiles ont une extrémité associée à un point focal d'adhésion et sont habituellement perpendiculaires à la circonférence des cellules. Ces faisceaux d'actine vont rejoindre les arcs transverses sous-corticaux qui, pour leur part, sont parallèles aux lamellipodes. (A) Des fibres de stress de rétraction sont habituellement observées chez les cellules en migration. Durant la phase de rétraction de la migration cellulaire, ce type de fibres de stress permet de ramener la queue de rétraction cellulaire vers le corps cellulaire suite au démantèlement des FAs soutenant l'extrémité cette queue (Iwanicki et al., 2008; Tojkander et al., 2012). (C) Les fibres de stress ventrales constituent le principal indicateur du phénotype contractile de type fibroblastique des cellules non musculaires. Elles se forment entre les FAs suite à la stimulation soutenue de la contraction de l'actomyosine et s'organisent habituellement en réseaux parallèles assemblés en direction de l'axe longitudinal de l'étalement cellulaire. (A-C) La phalloïdine-TRITC, (A) un anticorps contre la vinculine (tableau 1) et (B et C) le DAPI ont respectivement été utilisés pour marquer le cytosquelette d'actine (en vert), les sites d'adhésion des intégrines (en rouge) et le noyau (en bleu) de cellules HIEC cultivées directement sur le plastique des pétris. [Schéma original, © D. Gagné, 2016]



**Figure 3**

### 1.1.7 Les Rho GTPases

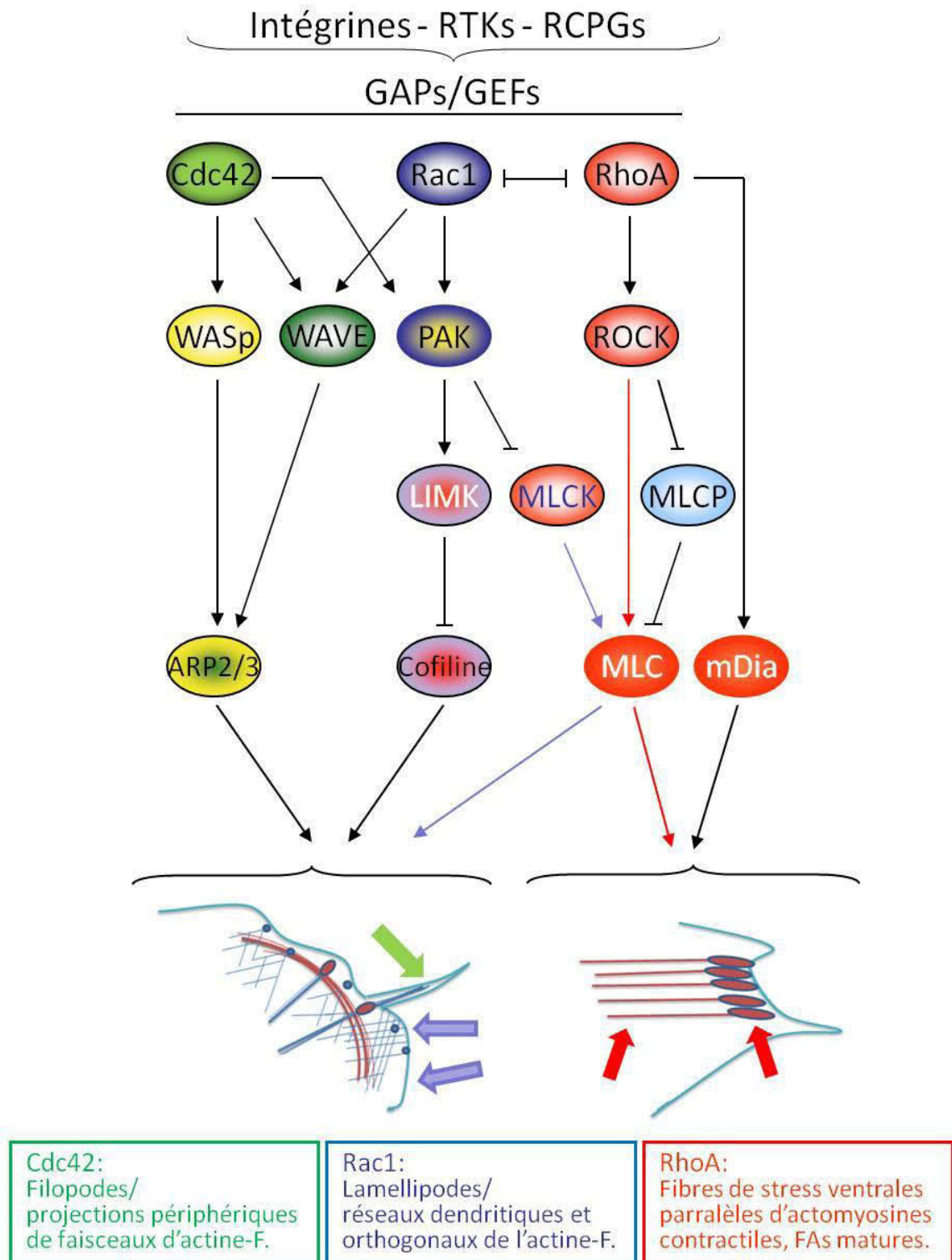
Le contrôle de l'architecture et des fonctions du cytosquelette d'actine dépend principalement du contrôle de l'activité des principaux régulateurs de l'axe intégrine-actine (p. ex. ROCK, PAK) par les protéines de la famille des Rho GTPases (Figure 4) (Murali and Rajalingam, 2014). Chez l'humain, il existe vingt gènes de Rho GTPases différents (p. ex. RhoA, RhoC, Rac1, Cdc42) classées en six sous-familles phylogénétiques (p. ex. Rho, Rac, Cdc42) (DeGeer and Lamarche-Vane, 2013). Comme pour les autres classes de GTPases, les Rho GTPases sont actives sous leur forme liée au *guanosine triphosphate* (GTP) et inactives sous leur forme liée au GDP. Or, le relâchement du GDP et son remplacement par le GTP permettant l'activation des Rho GTPases est habituellement induit au niveau de la membrane plasmique par l'association de ces dernières avec les protéines de la classe des *Guanine Nucleotide Exchange Factor* (GEF ou RhoGEF) (Cherfils and Zeghouf, 2013; Vigil et al., 2010). D'autre part, les Rho GTPases possèdent une faible capacité intrinsèque à hydrolyser le GTP. Pour cette raison, le retour des Rho GTPases en conformation inactive lié au GDP dépend principalement des effets stimulants sur le taux d'hydrolyse du GTP des interactions entre les Rho GTPases et les protéines de la classe des *GTPase-Activating Proteins* (GAP ou RhoGAP). Une autre classe de protéines nommées *Guanosine nucléotide Dissociation Inhibitors* (GDI ou RhoGDI) agit également comme régulateur négatif des Rho GTPases (Cherfils and Zeghouf, 2013; DeGeer and Lamarche-Vane, 2013; Vigil et al., 2010). Les RhoGDI s'associent avec certains membres prénylés des Rho GTPases afin de séquestrer la forme inactive/GDP de ces dernières au niveau du cytosol. Plus précisément, les complexes Rho GTPase-GDI recouvrent le groupement prényle (farnesyl et géranyl-géranyl) C-terminal des Rho GTPases (Cherfils and Zeghouf, 2013). Cela entrave la capacité de ces dernières à s'associer avec la membrane plasmique et les vésicules de transport et en parallèle cela empêche leur activation membranaire et l'exécution de leurs fonctions.

Rac1, Cdc42 et RhoA sont typiquement reconnues comme les principaux membres des Rho GTPases. Rac 1 est reconnu pour son rôle crucial dans la formation des réseaux dendritiques d'actine-F dans les lamellipodes (Murali and Rajalingam, 2014). Pour sa part, Cdc42 permet la formation des minces faisceaux parallèles d'actine-F présents dans les filopodes (c.-à-d. les minces protrusions/projections filamenteuses de la membrane plasmique périphérique). Rac1 et



Figure 4 : Principaux rôles des Rho GTPases dans l'organisation structurale du cytosquelette d'actine

Ce schéma résume les voies de régulation modulées par les intégrines et les Rho GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 dans l'organisation du réseau d'actine cellulaire. Les intégrines et d'autres récepteurs transmembranaires, comme les récepteurs tyrosine kinases (RTKs) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont impliqués dans le contrôle des GEFs et des GAPs régulant l'activité des différentes Rho GTPases. Les voies de signalisation associées à Rac1 et Cdc42 régulent entre autres l'activité de la cofiline et du complexe Arg2/3. La formation des réseaux dendritiques/orthogonaux de l'actine-F dans les lamellipodes (flèches pleines bleues) dépend principalement de la signalisation par Rac1. La formation des minces projections filamenteuses d'actines-F des filopodes (flèche pleine verte) dépend typiquement de la signalisation par Cdc42. Les principaux effecteurs de RhoA sont ROCK et mDia et la coopération entre ces deux protéines est cruciale pour la nucléation des filaments d'actine formant les fibres de stress. Les fonctions de ROCK induisent une augmentation du niveau de  $pS18/pS19$ MLC, ce qui stimule le mouvement contractile de l'actomyosine et permet ultimement de générer les fibres de stress ventrales parallèles (flèche pleine rouge de gauche) et les FAs matures de type tardif (flèche pleine rouge de droite). [Schéma original, © D. Gagné, 2016]



**Figure 4**

Cdc42 sont directement impliquées dans la régulation des membres de la famille WASp/Scar/Wave qui coopère avec le complexe Arp2/3 afin de stimuler la polymérisation et le branchement des filaments d'actine (Figure 4). Ces deux Rho GTPases sont également centrales dans la régulation des kinases PAK (Murali and Rajalingam, 2014; Szczepanowska, 2009). Or, ces dernières sont directement impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. Par exemple, la phosphorylation et l'activation de la protéine sérine/thréonine kinase LIM-Kinase1 (LIMK1) par PAK1 permet à la LIMK1 de phosphoryler la <sup>S3</sup>cofiline afin d'inhiber cette dernière et d'empêcher son association avec l'actine-F conduisant à la dépolymérisation de ces filaments en monomère d'actine-G (Figure 4) (Szczepanowska, 2009).

Les fonctions de RhoA sont déterminantes dans l'élaboration des fibres de stress ventrales et ce rôle s'est avéré particulièrement important pour notre étude des fonctions de l'ILK chez les CEIs. Les principaux effecteurs de RhoA sont la protéine *diaphanous-related formin homolog 1* (mDia1) et les sérine/thréonine kinases de la classe *Rho associated kinase* (ROCK) (Figure 4) (Murali and Rajalingam, 2014). La coopération entre mDia1 et ROCK permet la nucléation des filaments d'actine lors de l'élaboration des fibres de stress à partir des complexes d'adhésion des intégrines naissants (Naumanen et al., 2008). L'activation de ROCK par RhoA engage également une série d'événements modulant positivement les niveaux de phosphorylation des sérines 18 et 19 de la MLC (<sup>pS18/pS19</sup>MLC) (Kassianidou and Kumar, 2015; Ueda et al., 2002). Or, c'est précisément cette forme phosphorylée de la MLC qui stimule l'activité catalytique de la myosine II permettant la contraction des structures d'actomyosine dans les fibres de stress (Burridge and Wittchen, 2013; Naumanen et al., 2008). ROCK peut phosphoryler directement les sérines 18 et 19 de la MLC (Amano et al., 1996; Katoh et al., 2001). ROCK empêche de plus la déphosphorylation de ces résidus sérines en phosphorylant directement la sous-unité régulatrice *myosin-binding subunit* (MBS) de la *myosin light chain phosphatase* (MLCP) afin de l'inhiber (MacDonald et al., 2001). ROCK phosphoryle également d'autres inhibiteurs de la MLCP afin de les activer (p. ex. les protéines CPI-17 et ZIPK) (Amano et al., 1996; Koyama et al., 2000; Ueda et al., 2002) et contribue à la stabilisation des filaments d'actine des fibres de stress en inhibant la LIMK1 (Kawano et al., 1999).

La *myosin light chain kinase* (MLCK) est une autre sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler directement les résidus sérines 18 et 19 de la MLC (Figure 4) (Katoh et al., 2010). Contrairement à l'activité de ROCK qui est régulée par RhoA, l'activité de la MLCK est

stimulée par la voie  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline et peut être inhibée par la kinase PAK via la voie Rac1-Cdc42/PAK. Puis, alors que ROCK est typiquement responsable de la formation des fibres de stress ventrales au niveau de la portion centrale des cellules, la MLCK induit généralement la formation des faisceaux d'actine-F et des fibres de stress en périphérie des cellules (Chang and Kumar, 2015; Katoh et al., 2010; Sanders et al., 1999). Les fonctions de la MLCK sont également impliquées dans la formation des lamellipodes durant les processus d'étalement et de migration cellulaire (Giannone et al., 2004). Elles permettent de plus de réguler — en coopération avec les fonctions de ROCK — l'organisation de l'actine-F associée aux sites d'adhésion intercellulaires, ainsi que durant le processus de division cellulaire (Collins and Nelson, 2015; Kosako et al., 2000; Poperechnaya et al., 2000; Sanders et al., 1999).

Mentionnons en terminant que les travaux de Groulx et coll. (2011) dans le laboratoire du Pr Beaulieu ont montré que l'inhibition de l'expression du collagène VI chez le modèle de CEI humaine HIEC intensifie la formation des fibres de stress ventrales parallèles. Ces travaux montrent également que cet effet de l'inhibition de l'expression du collagène VI est causé par une activation dérégulée de la voie MLCK/ $\text{p}^{\text{S19}}$ MLC, alors que chez les cellules HIEC natives la voie RhoA/ROCK/ $\text{p}^{\text{S19}}$ MLC est normalement la principale voie responsable de la formation de ces structures (Groulx et al., 2011). Les résultats de Groulx et coll. (2011) mettent ainsi en évidence l'importance de l'intégrité des interactions cellule-MEC pour le contrôle de l'implication de ces deux voies dans la formation des fibres de stress chez les cellules HIEC.

#### *1.1.8 Rôle des Rho GTPases dans la régulation de l'axe MEC-intégrine-actine*

Les Rho GTPases se trouvent au carrefour des voies signalétiques contrôlant l'organisation structurale et fonctionnelle de l'axe MEC-intégrine-actine (Hall, 2005; Provenzano and Keely, 2011). Ceci confère à ces enzymes un rôle central dans l'orchestration des voies de mécanotransduction responsables de contrôler la réponse des cellules aux propriétés de l'environnement et plus spécialement de la MEC. Par exemple, chez la plupart des modèles cellulaires qui adhèrent et s'étalent sur un substrat de fibronectine, l'activité de RhoA et de l'activité de Rac1 sont régulées de façon opposée afin de permettre l'exécution normale du processus d'étalement (Arthur et al., 2000). Plus précisément, l'association initiale de la fibronectine aux intégrines permet par exemple d'induire l'activation locale du duo Src-FAK. Ce

complexe est entre autres responsable de la phosphorylation des protéines adaptatrices telles que la paxilline (résidus tyrosines Y31 et Y118) et p130Cas (tyrosine dans les motifs YXXP)) dans les structures d'adhésion en formation de type FX (Huveneers and Danen, 2009; Vigil et al., 2010). Ces phosphorylations mènent ensuite à l'inhibition de RhoA via des mécanismes pouvant impliquer FAK et le recrutement des protéines p120RasGAP et p190ARhoGAP. Parallèlement, les GEF de Rac telles que Dock180-ELMO1 et  $\beta$ -PIX permettent de stimuler l'activité de Rac1 (Huveneers and Danen, 2009). L'antagonisme fonctionnel de RhoA et de Rac1 dans ce contexte est considéré comme essentiel pour l'exécution de la phase précoce (isotropique) du processus d'adhésion/étalement (Dubin-Thaler et al., 2008; Giannone et al., 2004). Durant cette phase, les cellules en culture 2D présentent une morphologie relativement symétrique et arrondie qui est associée à la formation de larges lamellipodes et à une organisation précontractile de type cortical et/ou dendritique/orthogonal de l'actine-F (voir la figure 3B et la figure 4) (Xiong et al., 2010; Zemel et al., 2010). Éventuellement, le recrutement des GAP de Rac1 (p. ex. ARF, GIT1, Tiam 1, Vav 2 et PKL/GIT2) et de GEF de RhoA (p. ex. p115RhoGEF, p190RhoGEF et LARG) dans les FAs en développement entraîne l'inhibition de Rac1, la réactivation de RhoA et la transition vers la phase tardive (anisotropique) de l'étalement (Huveneers and Danen, 2009; Lawson and Burridge, 2014; Zemel et al., 2010). Cette transition est corrélée dans le temps avec l'apparition des structures cellulaires RhoA-dépendantes représentatives de la morphologie planaire polarisée de type fibroblastique (phénotype contractile) telles que les fibres de stress ventrales, les FAs matures et les FBs (Prager-Khoutorsky et al., 2011). L'activation mécanodépendante optimale de la voie RhoA/ROCK lors de la phase anisotropique de l'étalement nécessite que les propriétés mécaniques des différents modules et interfaces de l'axe MEC-intégrine-actine puissent supporter l'augmentation de la tension isométrique durant de cette phase. Dans cette optique, il est pertinent de souligner que l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire dans la MEC est déterminant pour autoriser le développement des structures RhoA-dépendantes de l'axe MEC-intégrine-actine. En effet, ce processus est impliqué dans la formation d'une MEC plus rigide et en parallèle, il augmente l'adhésivité cellule-MEC en permettant la formation des complexes adhésifs entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine (Danen et al., 2002; Engler et al., 2009; Friedland et al., 2009; Prager-Khoutorsky et al., 2011; Roca-Cusachs et al., 2009; Shi and Boettiger, 2003).

### *1.1.9 Principales étapes de l'élaboration des FXs et des FAs*

Malgré la grande complexité des structures d'adhésion des intégrines (2412 protéines potentiellement impliquées dans « l'adhesome » cellulaire des intégrines ont été recensées par Horton et coll. en 2015 (Horton et al., 2015)), le cycle continu de formation, de maturation et de démantèlement de ces structures peut être schématisé en quelques étapes représentatives de ce qui est observé chez la majorité des types cellulaires en culture 2D (Gardel et al., 2010; Geiger and Zaidel-Bar, 2012). D'abord, suite à l'adhésion initiale des cellules, des FXs se forment à partir des sites d'adhésion naissants constitués de petits agrégats (diamètre  $< 0.25 \mu\text{m}^2$ ) d'intégrines membranaires (Gardel et al., 2010). Ces FXs résident en bordure des lamellipodes, mesurent de  $0.50$  à  $1 \mu\text{m}^2$  et sont entre autres formés des protéines adaptatrices taline, vinculine et paxilline (Gardel et al., 2010; Zaidel-Bar et al., 2004). Rapidement, l'activité soutenue de Rac1 stimule le branchement dendritique de l'actine-F par le complexe Arp2/3 et l'arrimage de la myosine II aux sites d'adhésion en formation (Pasapera et al., 2015). L'augmentation de la tension isométrique au sein de l'axe intégrine-actine induit ensuite l'élongation et le glissement de certains FXs vers l'intérieur des lamellipodes (qui s'étendent en direction opposée) afin de former les « FAs immatures » ou « FAs de type précoce » (Gardel et al., 2010; Giannone et al., 2004). Éventuellement, si les conditions le permettent (p.ex. sur une MEC suffisamment rigide), la transition d'une signalisation de type Rac1 vers une signalisation de type RhoA induit la formation des fibres de stress ventrales contractiles et l'accrétion mécanodépendante des protéines adaptatrices dans les FAs immatures. Cela conduit au développement des FAs de type tardif à la base des lamellipodes (Gardel et al., 2010; Zimerman et al., 2004). Ces structures d'adhésion matures sont plus imposantes (jusqu'à  $10 \mu\text{m}$  de longueur et de  $2$  à  $3 \mu\text{m}$  de largeur) et présentent un enrichissement pour certains types de protéines adaptatrices (p. ex. p130Cas, zyxine et  $\alpha$ -actinine) et de protéines kinases (p. ex. AKT, PAK et Crk) (Zaidel-Bar et al., 2004). L'existence des FAs s'achève par leur démantèlement qui nécessite entre autres le clivage protéolytique de la taline et de FAK par des protéases de la famille des calpaïnes (Chan et al., 2010; Franco et al., 2004; Webb et al., 2004).

### 1.1.10 Formation des FBs et fibrillogénèse de la fibronectine

La fibronectine est sécrétée sous la forme d'homodimères solubles (de 230 à 270 kDa selon l'isoforme) dont les deux sous unités jointes en C-terminal par un pont disulfure sont repliées de façon antiparallèle par de nombreuses interactions électrostatiques intramoléculaires (Johnson et al., 1999). Sous cette forme compacte, la plupart des sites d'interactions importants de la fibronectine — désignés en tant que « sites cryptiques » — sont inaccessibles (Ohashi and Erickson, 2009; Singh et al., 2010). Ces sites deviennent accessibles uniquement lorsque les homodimères solubles de fibronectine associés aux intégrines à la surface des cellules sont étirés et « s'ouvrent » sous l'effet de la tension mécanique transmise via ces récepteurs transmembranaires (Carraher and Schwarzbauer, 2013; Gee et al., 2008; Singh et al., 2010). Plusieurs des sites cryptiques de la fibronectine permettent de lier directement des intégrines (p. ex.  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  et  $\alpha v\beta 1/\beta 3/\beta 5/\beta 6$ ) et des constituants de la MEC (p. ex. collagènes, télescine-C). Alors que d'autres servent spécifiquement à diriger son auto-association et sa multimérisation lors du processus de fibrillogénèse durant laquelle cette protéine est assemblée en MEC fibrillaire (Leiss et al., 2008; Singh et al., 2010).

Le processus de déposition/assemblage/fibrillogénèse de la fibronectine se fait en plusieurs étapes et requiert la contribution de ses sites d'interactions cryptiques. En premier lieu, l'association des homodimères compacts et solubles de la fibronectine à la surface des cellules s'effectue via un domaine présent dans le fragment protéolytique N-terminal de 70 kDa de la fibronectine (Tomasini-Johansson et al., 2006). Ce fragment est suffisant pour le recrutement de la fibronectine au niveau des sites d'adhésion cellule-MEC des intégrines et contient le domaine cryptique N-terminal d'assemblage (domaine FNI<sub>1</sub> à FNI<sub>5</sub>) de la fibronectine qui est indispensable pour le processus de fibrillogénèse (Tomasini-Johansson et al., 2006; Zhong et al., 1998). Ce sont toutefois les interactions entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la fibronectine soluble qui permettent d'exposer la séquence RGD du domaine FNIII<sub>10</sub> de la fibronectine servant de site primaire d'interaction pour les intégrines. Dans ce cas, l'engagement entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la fibronectine produit un lien adhésif « relaxé » (*relaxed bonds*) (Friedland et al., 2009). Les forces de tension initiales transmises à la fibronectine par l'axe intégrine-actine exposent ensuite les sites cryptiques d'auto-association qui interagissent avec la portion N-terminale d'autres homodimères de fibronectine (Gee et al., 2013; Vakonakis et al., 2007). Cela stimule

l'agrégation de la fibronectine partiellement étirée (ou préfibrillaire) et des intégrines dans les sites d'adhésion des intégrines et permet d'initier une signalisation de type *outside-in* (p. ex. phosphorylation du résidu tyrosine Y861 de FAK) (Shi and Boettiger, 2003; Singh et al., 2010; Vakonakis et al., 2007). L'augmentation graduelle de la tension qui est appliquée par les fibres de stress ventrales en formation instaure un effet synergique entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , la séquence RGD du domaine FNIII<sub>10</sub> et la séquence Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) du domaine FNIII<sub>9</sub> (ou site « synergique ») de la fibronectine. Cet effet supporte la prise en charge efficace des forces de tension plus élevées par le complexe  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine et permet la transition du lien adhésif « relaxé » vers un lien « sous tension » (*tensioned bonds*) plus adhésif et plus stable de type *catch bond* (Friedland et al., 2009; Kong et al., 2009). Fait à noter, il a été démontré chez le modèle cellulaire HT 1080 que la formation du lien sous-tension stimule la phosphorylation du résidu tyrosine Y397 de FAK qui est entre autres important pour la formation du complexe Src-FAK (Bouchard et al., 2007; Friedland et al., 2009). Éventuellement, la forte tension appliquée par les fibres de stress séquestrent l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la tensine sur le segment interne des FAs, et ce, jusqu'à ce que les FBs se dissocient des FAs et assemblent de minces fibrilles de fibronectine en longeant les fibres de stress ventrales (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000). Ces fibrilles s'accumulent et sont ensuite assemblées de façon irréversible en un réseau de fibres insolubles dont les propriétés biochimiques et biomécaniques sont importantes afin d'induire les événements signalétiques stimulant le développement du phénotype cellulaire contractile et d'autres fonctions cellulaires (p. ex. prolifération, étalement, migration) (Singh et al., 2010). Dans ce cas, l'exposition mécanodépendante du site cryptique de liaison à l'héparine du domaine FNIII<sub>1</sub> de la fibronectine serait centrale pour médier la bioactivité de la fibronectine fibrillaire (Roy and Hocking, 2013).

En terminant, il est pertinent de souligner que l'insolubilité de la fibronectine fibrillaire au détergent désoxycholate permet d'isoler expérimentalement ce type de matrice et ainsi d'analyser la capacité des cellules en culture à déposer et assembler la fibronectine (Yuan et al., 2010). Parmi les facteurs connus les plus importants influençant le processus de fibrillogénèse de la fibronectine, notons : 1) la composition des domaines exprimés dans la fibronectine cellulaire (Cseh et al., 2010), 2) l'expression ou l'activation cellulaire de ses corécepteurs (p. ex. le syndecan-2 et -4, uPar, différentes RTKs tels que l'EGFR et les protéines de la famille Eph) et des partenaires cytoplasmiques des intégrines (p. ex. taline, kindline, filamine, ILK) (Guo and



Wu, 2002; Julich et al., 2009; Xu et al., 2009) et 3) la nature et les propriétés physico-chimiques du matériau (p. ex. verre, plastique traité des pétris) ou du substrat exogène d'adhésion (p. ex. fibronectine, vitronectine, laminine) des cellules en culture (Fauchoux et al., 2006; Katz et al., 2000; Xu et al., 2009).

## *1.2 La muqueuse intestinale*

### *1.2.1 Constitution générale de l'intestin*

L'axe antéro-postérieur de l'intestin de la majorité des espèces de mammifères forme un long tube divisé en deux compartiments anatomiquement et fonctionnellement distincts soit l'intestin grêle (compartiment proximal) et le gros intestin (compartiment distal) (Marieb, 1993; Turner and Turner, 2010). L'intestin grêle est lui-même scindé en trois segments successifs : le duodénum (long de 30 cm chez l'humain) situé directement après l'estomac, ensuite le jéjunum (de 2 à 3 m chez l'humain) et pour terminer l'iléon (de 4 à 5 m chez l'humain). Bien que la morphologie et les fonctions de chacun de ces segments soient analogues, l'intestin grêle présente dans l'ensemble un gradient continu de modifications de ses caractéristiques morphologiques et de ses spécialisations fonctionnelles (e.g., enzymes sécrétées, nutriments préférentiellement absorbés) (Turner and Turner, 2010). Ainsi, l'essentiel des processus digestifs tels que la sécrétion des enzymes et des hormones digestives et l'assimilation des éléments nutritifs (e.g. acides aminés et peptides, acide gras, minéral, vitamines) est effectué au sein de l'intestin grêle. Le gros intestin suit l'iléon et se compose dans l'ordre du caecum, du côlon et du rectum. Le côlon sert surtout à l'absorption de l'eau et de certains nutriments résiduels afin de concentrer le chyme et de stocker ce qui n'a pas été absorbé avant son évacuation.

La couche externe de l'axe transverse du tube intestinal est formée de la membrane séreuse (péritoine viscéral) qui enveloppe les organes de la cavité péritonéale (Marieb, 1993; Sancho et al., 2004). Sous ce revêtement se trouve la musculature qui comporte deux couches de muscles lisses superposées disposées en une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Ce sont ces deux couches musculaires qui sont responsables du mouvement de péristaltisme de l'intestin. L'avant-dernière couche est formée par la sous-muqueuse qui est constituée d'un tissu conjonctif dense supportant l'architecture en plis et replis

du conduit intestinal. La sous-muqueuse comporte également plusieurs éléments du système nerveux entérique, du système sanguins et du système lymphatiques qui rejoignent et supportent les fonctions de la muqueuse qui recouvre la paroi luminal (couche interne) de l'intestin.

### 1.2.2 L'épithélium intestinal et l'axe crypte-villosité

L'axe transverse de la muqueuse de l'intestin grêle consiste en trois compartiments distincts et superposés (Figure 5) soit : la *muscularis mucosae* qui longe la sous-muqueuse à la base de la muqueuse, la *lamina propria* qui est superposé à la *muscularis mucosae* et finalement l'épithélium glandulaire de type prismatique simple qui recouvre la *lamina propria* (Marieb, 1993). À l'image de la *lamina propria* des autres muqueuses de l'organisme, celle de l'intestin se développe à partir du mésenchyme fœtal. Les nombreux fibroblastes et myofibroblastes sous-épithéliaux de la *lamina propria* sont responsables de l'expression et de l'assemblage de la majorité des constituants de la MEC de la *lamina propria* et sécrètent plusieurs facteurs solubles importants pour la morphogénèse et l'homéostasie de la muqueuse intestinale (p. ex. Wnt, BMP, TGF- $\beta$ , EGF, Fox11) (Ménard et al., 2005; Powell et al., 2011). La *lamina propria* est de plus irriguée par un réseau de capillaires sanguins servant aux échanges de nutriments et de facteurs solubles entre la muqueuse intestinale et le système sanguin (Medema and Vermeulen, 2011; Powell et al., 2011). Ce compartiment contient également plusieurs capillaires lymphatiques — et un vaisseau chylifère par villosité — permettant de coupler le système immunitaire à la barrière épithéliale (Gallo and Hooper, 2012). Le pôle basal des CEIs formant le feuillet épithélial est abluminal et adhère sur la lame basale qui délimite la partie supérieure de la *lamina propria*, alors que le pôle apical des CEIs tapisse l'intérieure du tube intestinal et est en contact direct avec le bol alimentaire luminal en transit (Marieb, 1993; Turner and Turner, 2010).

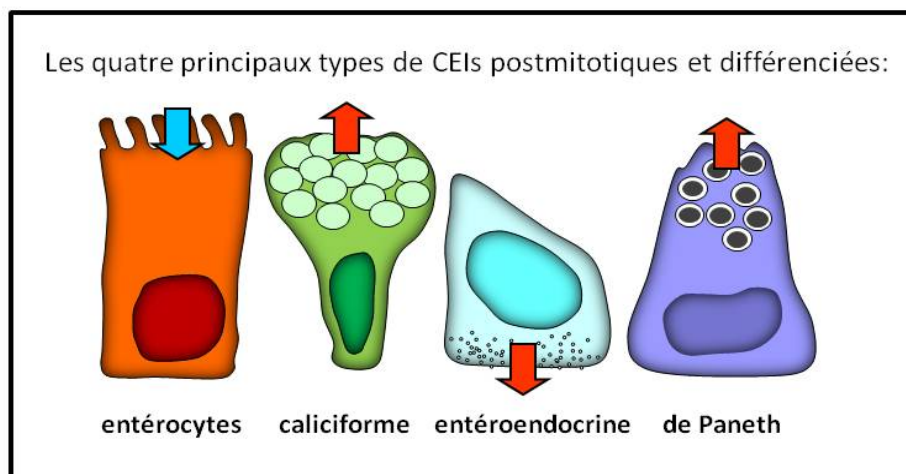
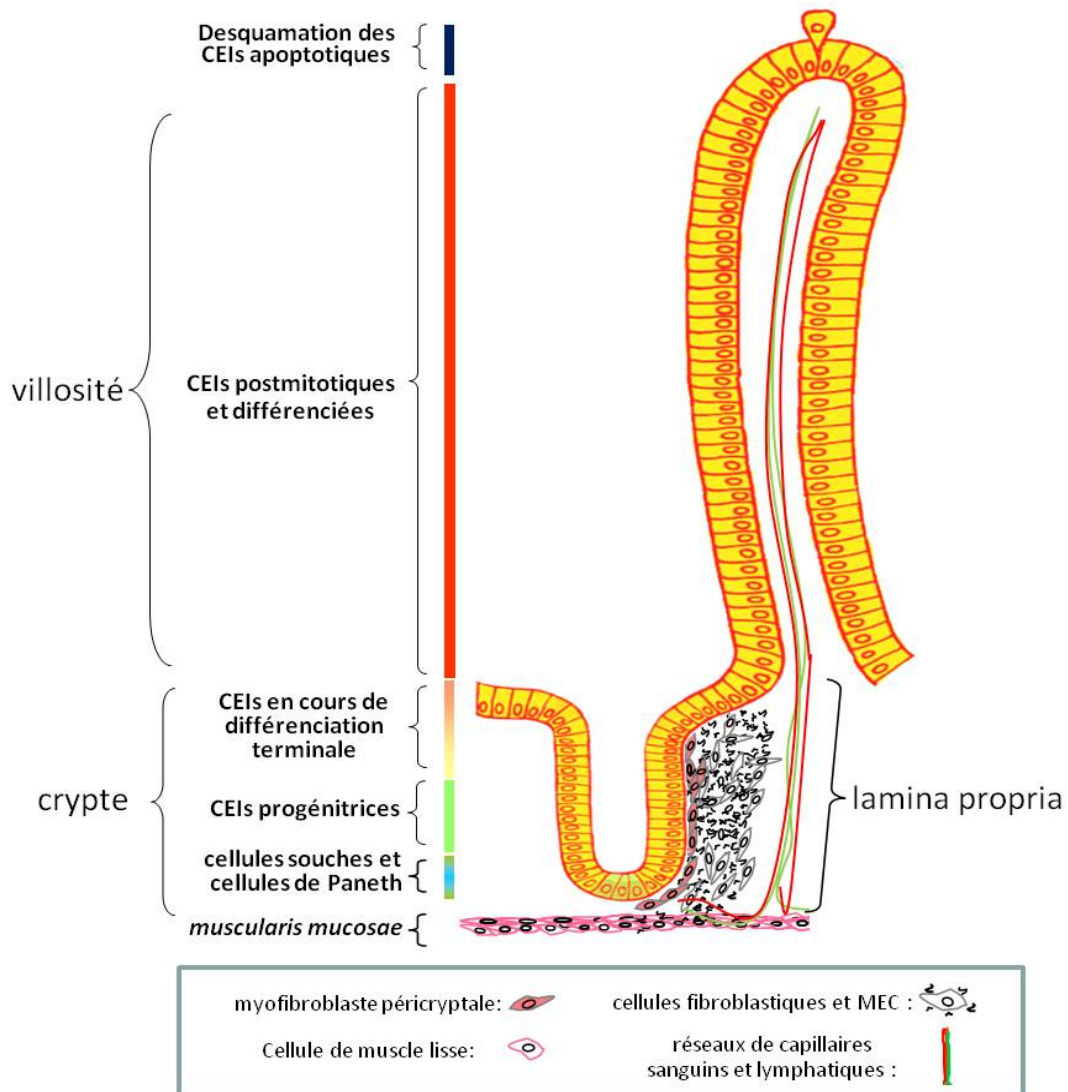
La partie supérieure de la muqueuse intestinale est constituée par une multitude de dépressions profondes et de longues protubérances de la *lamina propria* et de l'épithélium (Beaulieu, 1997; Sancho et al., 2004). Ces structures nommées respectivement cryptes de Lieberkühn (cryptes) et villosités forment ensemble l'axe crypte-villosité qui est l'unité architecturale et fonctionnelle de base de la muqueuse de l'intestin grêle (Figure 5). Chez l'humain, l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle complète sa morphogénèse entre la 18<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine de gestation (Beaulieu, 1997). Les cryptes sont l'enceinte de l'entièreté des processus de

prolifération et de différenciation servant au renouvellement continu des CEIs matures et fonctionnelles (Beaulieu, 1997; Sancho et al., 2004). Selon le modèle classique, de quatre à six cellules souches multipotentes « cp 4 » résident à l'intérieur d'une niche spécifique localisée vers la quatrième et la cinquième position de l'axe vertical des cryptes (Figure 5) (Potten et al., 2009). Cette population de CEIs clonogéniques est caractérisée par l'expression de la protéine Bmi-1, un membre du « Polycomb repressive complexe 1 » (PRC1). Ce complexe est connu pour gouverner de nombreux mécanismes de répression génétique liés à la conservation des caractéristiques souches des cellules épithéliales (p. ex. capacité d'auto-renouvellement) (Margueron and Reinberg, 2011). Le modèle de l'organisation des cellules souches intestinales qui est actuellement le plus accepté chez les mammifères propose qu'entre douze et seize cellules souches « crypt base columnar » (CBC) exprimant fortement la protéine Lgr5 soient intercalées entre les cellules de Paneth à la base de chaque crypte (Clevers, 2013). Selon ce modèle, les cellules souches Bmi-1 positives de la quatrième/cinquième position cellulaire sont généralement quiescentes et ont pour fonctions de remplacer périodiquement la perte des cellules CBC causée par les différents stress physiologiques.

Les cellules filles des cellules souches sont à l'origine des deux populations de cellules progénitrices (Figure 5) commises à se différencier vers l'une ou l'autre des deux grandes voies de différenciation épithéliale de l'intestin, soit la voie des cellules sécrétrices et la voie des cellules absorbantes (Potten et al., 2009). Les cellules progénitrices effectuent de trois à six rondes de division cellulaire (selon leur futur type cellulaire), tout en migrant vers le tiers supérieur des cryptes où elles entament alors leur processus de différenciation terminal et cessent de proliférer (Figure 5). Trois des quatre types majeurs de CEIs différenciées intègrent ensuite les villosités, soit : 1) les cellules caliciformes (ou cellules à gobelet ; lignée sécrétrice) responsables de l'expression du mucus protecteur enrobant la muqueuse, 2) les cellules entéroendocrines (lignée sécrétrice) qui sécrètent diverses hormones servant à réguler les fonctions digestives (p. ex. sérotonine) et 3) les entérocytes (lignée absorbante) qui forment la population la plus abondante ( $\approx 90\%$ ) des villosités (Khan and Ghia, 2010; Potten et al., 2009). Soulignons dans ce dernier cas que le pôle apical des entérocytes présente de nombreuses microvillosités caractéristiques nommées « bordure en brosse » permettant de maximiser la surface absorbante de l'épithélium intestinal afin de favoriser le passage transépithélial des

## Figure 5 : La muqueuse intestinale

La muscularis mucosae se trouve à la base de la muqueuse intestinale et est constituée de muscle lisse servant aux mouvements localisés de la glande intestinale. La lamina propria est un tissu conjonctif lâche superposé à la muscularis mucosae supportant l'architecture et les fonctions de l'épithélium glandulaire de type prismatique simple qui recouvre l'axe crypte-villosité. Les échanges entre la muqueuse et l'organisme sont assurés par un réseau de capillaires sanguins et lymphatiques parcourant la lamina propria. Les nombreux fibroblastes de la *lamina propria* sont responsables de l'expression et de l'assemblage de la majorité des constituants de la MEC de ce compartiment, tandis que l'expression et l'assemblage des constituants de la lame basale qui délimite la partie supérieure de la *lamina propria* se fait conjointement par les myofibroblastes sous-épithéliaux et les CEIs. Ainsi, le pôle basal des CEIs formant le feuillet épithélial est abluminal et adhère sur la lame basale. Les cellules souches épithéliales multipotentes situées à la base des cryptes sont responsables du renouvellement des cellules progénitrices prolifératives et indifférenciées de la portion inférieure des cryptes. Ces dernières sont néanmoins commises vers l'une ou l'autre des deux grandes voies de différenciation épithéliale de l'intestin, soit la voie des CEIs absorbantes (entérocyte) et la voie des CEIs sécrétrices (cellules caliciformes, entéroendocrines et de Paneth). Les cellules progénitrices migrent vers les villosités et exécutent leur processus de différenciation terminal au niveau du tiers supérieur des cryptes. Les entérocytes (les CEIs les plus abondantes dans les villosités), les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines intègrent ensuite les villosités et forment ensemble l'épithélium villositaire. De trois à cinq jours s'écoulent entre la naissance des cellules progénitrices et l'élimination des cellules apoptotiques à l'extrémité des villosités. Les cellules de Paneth migrent pour leur part en direction opposée jusqu'à ce qu'elles rejoignent leur niche au fond des cryptes avec les cellules souches de type CBC. [Figure produite à partir de schémas fournis par le Pr Jean-François Beaulieu]



**Figure 5**

nutriments et des ions vers la *lamina propria* (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009). Les trois principaux types de CEIs villositaires migrent graduellement vers l'extrémité des villosités où elles entrent alors en apoptose et sont larguées dans la lumière intestinale (Vachon, 2011). Une période de trois à cinq jours est comptée entre la naissance de ces cellules à la base des cryptes et leur exfoliation à l'apex des villosités. Les cellules de Paneth forment le quatrième type majeur de CEI mature et différenciée (lignée sécrétrice) (Potten et al., 2009). Ces cellules migrent pour leur part vers la base des cryptes avant d'avoir complété leur différenciation terminale, et ce, jusqu'à ce qu'elles rejoignent leur niche au fond des cryptes entre les cellules souches de type CBC. Les cellules de Paneth sécrètent alors plusieurs molécules à action antimicrobienne (p. ex. les lysozymes et les peptides de la classe des défensines), ainsi que des facteurs paracrines (p. ex. EGF, Wnt3) cruciaux pour la régulation des fonctions de la muqueuse intestinale et potentiellement impliqués dans la formation de la niche des cellules souches épithéliales. La cohésion physique et fonctionnelle du feuillet épithélial intestinal pendant la migration des CEIs est assurée en majeure partie par l'adhésion des intégrines à la lame basale et par l'adhésion latérale intercellulaire médiée par différents types de complexes d'adhésion cellule-cellule (principalement les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes) (Escaffit et al., 2005a; Escaffit et al., 2005b; Ménard et al., 2005). Ainsi, la couche cellulaire unique formée par les CEIs se comporte d'une part comme une cloison étanche contre les micro-organismes de la flore intestinale et d'autre part comme une membrane perméable et sélective envers les nutriments qui transitent dans la lumière intestinale (Shimizu, 2010; Turner and Turner, 2010).

### 1.2.3 Expressions et fonctions des intégrines chez les CEIs

Les CEIs formant l'épithélium intestinal présentent une régulation spatio-temporelle des intégrines exprimées durant le développement, ainsi que le long de l'axe crypte-villosité et de l'intestin (Lussier et al., 2000; Ménard et al., 2005). Or, l'ensemble des travaux de caractérisation de l'expression des intégrines par les CEIs et de la distribution de leurs ligands potentiels dans la lame basale de l'axe crypte-villosité permet de dresser un tableau relativement précis des fonctions principales des différents couples intégrine-ligand chez ce type cellulaire. Par exemple, l'expression des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 8\beta 1$  — deux récepteurs de la séquence RGD de la fibronectine — est principalement détectée chez les CEIs des cryptes, ce qui s'accorde

relativement bien avec le patron de distribution de la fibronectine dans la lame basale sous-jacente (Benoit et al., 2012; Gagne et al., 2010). Puis, conformément au rôle suggéré par cette distribution particulière, la littérature démontre que ces deux intégrines sont impliquées dans l'adhésion et la prolifération RGD et/ou fibronectine-dépendante chez les CEIs cultivées *ex vivo* (p. ex. HIEC, RIE1, Caco-2) (Benoit et al., 2009; Gagne et al., 2010; Groulx et al., 2011; Vachon et al., 1995; Wang et al., 2010). D'autre part, les CEIs des cryptes expriment également les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$ , ce qui leur permet plausiblement d'adhérer fermement sur le collagène de la lame basale de ce compartiment (Boudjadi et al., 2013; Lussier et al., 2000). Or, le profil d'expression cryptal des intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  favorisant l'adhésion des CEIs prolifératives et indifférenciées sur la fibronectine et le collagène (en plus des laminines) est substitué par un profil d'expression des intégrines favorisant l'adhésion prépondérante aux laminines (principalement la LN-332 et la LN-551) chez les CEIs du tiers supérieur des cryptes en cours de différenciation terminale et chez les CEIs différenciées des villosités (Gout et al., 2001; Teller et al., 2007). Plus précisément, d'une part l'expression de l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$  est uniquement détectée chez les CEIs du tiers supérieur des cryptes et du tiers inférieur des villosités de l'intestin grêle. Et d'autre part, l'expression des intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4\text{ctd}^+$  est uniquement détectée chez les CEIs matures et fonctionnelles des villosités (Beaulieu, 2010; Lussier et al., 2000). Or, en accord avec la distribution de l'expression de ces récepteurs des laminines ( $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4\text{ctd}^+$ ) chez les CEIs de l'axe crypte-villosité, différents travaux rapportent que ces intégrines favorisent la polarisation basale-apicale, la différenciation et le maintien des caractères polarisés chez des modèles cellulaires du processus de différenciation des CEIs (p. ex. Caco-2/15, HT-29) (Basora et al., 1997; Beaulieu, 2010; Schreider et al., 2002; Stutzmann et al., 2000; Wang et al., 2010). Les variations du répertoire spécifique des intégrines exprimées par les CEIs en fonction de leur contexte illustrent bien le rôle central que joue les interactions entre les intégrines et les constituants de la lame basale dans la régulation spatio-temporelle des activités et comportements exécutés par ce type cellulaire (il est à noter que les intégrines exprimées par les CEIs dans différents contextes cellulaires sont indiquées dans la figure 1).

### 1.3 Hypothèse(s) et objectifs

Tel que nous l'avons mentionné précédemment, l'ILK est une protéine adaptatrice des sites d'adhésion cellule-MEC des intégrines dont les fonctions ont été associées à la régulation de voies de signalisation (p. ex. Wnt), d'activités cellulaires (p. ex. assemblage de la MEC) et des principaux comportements cellulaires (p. ex. prolifération, différenciation, migration). L'ILK est également le constituant central du complexe tripartite PIP qui est impliqué dans le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices dans les FAs. D'autre part, il est bien établi que les interactions intégrine-ligand des CEIs constituent l'un des pivots contrôlant les prises de décisions de ces cellules lors de leur progression le long de l'axe crypte-villosité. Considérant ces informations, il n'est pas étonnant que la littérature indique que la dérégulation de l'expression et des fonctions de l'ILK chez les CEIs soit associée à des processus tels que la transition épithélium-mésenchyme et le cancer colorectal. Notre hypothèse principale était donc que l'expression et les fonctions de l'ILK chez les CEIs normales soient importantes pour l'intégrité des fonctions des intégrines impliquées dans la régulation des processus et comportements cellulaires fondamentaux pour l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Mes travaux de doctorat visaient principalement à : 1) déterminer l'expression de l'ILK et du complexe PIP en fonction du contexte cellulaire (prolifératif vs différencié) chez les CEIs de l'axe crypte-villosité humain (*in vivo*) et chez les modèles de CEIs humaines en culture (*ex vivo*), 2) analyser le ou les rôles de l'ILK dans la régulation des principaux comportements cellulaires des CEIs et 3) identifier le ou les mécanismes importants pour ces rôles potentiels de l'ILK chez les CEIs normales.

Afin de répondre à ces trois objectifs, nous avons utilisé deux approches complémentaires :

- La première visait à caractériser l'expression et la distribution de l'ILK et des autres membres du complexe PIP chez les CEIs de l'axe crypte-villosité intestinal humain, de même que chez le modèle des CEIs indifférenciées HIEC et le modèle du processus de différenciation entérocytaire Caco-2/15.
- La deuxième consistait à analyser les fonctions de l'ILK dans les principaux processus et comportements des CEIs, et ce, principalement par le biais d'un ARN interférent spécifique permettant d'inhiber l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC et Caco-2/15.



## Matériels et Méthodes

### 2.1 Culture cellulaire

#### 2.1.1 Cellules HIEC

La lignée cellulaire HIEC-6 (Human intestinal epithelial cell, HIEC) a été générée à partir d'un iléon fœtal humain de 18 à 20 semaines (Perreault and Beaulieu, 1996). Les cellules de cette lignée normale et non immortalisée demeurent indifférenciées et présentent des caractéristiques proches des cellules épithéliales prolifératives et indifférenciées de la crypte intestinale (Pageot et al., 2000; Tremblay et al., 2006). Ces cellules sont cultivées à 37°C dans le milieu Opti-MEM® (Gibco-Invitrogen Corp., Eugene, OR) contenant 4 % (v/v) de sérum de veau fœtal (FBS) CELLect™ Gold (MP Biomedicals, Solon, OH), 2 mM de glutamine (Gibco BRL), 10mM HEPES (Gibco-Invitrogen) et 5 ng/ml d'EGFh (BD Biosciences, Bedford, MA), dans une atmosphère 95 % air et 5 % CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé toutes les 48 heures et les cellules sont ensuite réensemencées un dans trois à l'atteinte de la confluence.

#### 2.1.2 Cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 est un clone de la lignée parentale Caco-2 (Beaulieu et Quaroni, 1991) (ATCC, Manassas, VA). Les cellules de cette lignée entament spontanément un processus de différenciation de 30 jours à l'atteinte de la confluence et expriment graduellement différents marqueurs de différenciation (p. ex. sucrase-isomaltase, villine) au cours de ce processus (Beaulieu and Quaroni, 1991; Pageot et al., 2000; Tremblay et al., 2006). Ces cellules sont cultivées dans du DMEM (Gibco-Invitrogen) contenant 10 % (v/v) FBS CELLect™ Gold (MP Biomedicals), 4 mM de glutamine (Gibco-Invitrogen) et 20mM HEPES (Gibco-Invitrogen), à 37°C dans une atmosphère à 95 % air et 5 % CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé aux 48 heures et les cellules sont ensuite réensemencées un dans cinq avant la confluence.

## 2.2 Transfection et transduction cellulaire

### 2.2.1 Transfection des ARN interférents

L'ARN interférent contrôle, *non-silencing negative control siRNA* (siCNS) a été acheté de Qiagen (Mississauga, ON, Canada) et l'ARN interférent contre ILK (siILK) a été acheté d'Ambion (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX). La journée qui précède la transfection,  $2 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  sont ensemencées dans des *boîtes de Petri de culture cellulaire* (pétri) (35 mm, 60 mm, 100 mm; Falcon plastics, Los Angeles, CA) dont le diamètre est déterminé en fonction du nombre total de cellules requises pour l'expérience. Les cellules sont transfectées 24 heures plus tard avec les siRNA (40 nM concentration finale). Les agents de transfection liposomal X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) pour les cellules HIEC et HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen, Mississauga, ON) pour les cellules Caco-2/15 ont été utilisées conformément aux instructions du fabricant. Des analyses par immunobuvardage ont permis de déterminer que l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les CEIs en culture est effective approximativement 36 heures après la transfection du siILK (données non présentées). Ainsi, les cellules sont considérées comme prêtes à être utilisées pour les expériences approximativement 48 heures après les transfections des siRNA (siCNS et siILK).

### 2.2.2 Transduction du vecteur d'expression V5-tagged wtILK

Le vecteur qui code la forme sauvage d'ILK, le vecteur V5-tagged wtILK est un généreux don du Dr Shoukat Dedhar (University of British Columbia, BC). L'établissement d'une population stable de cellules HIEC exprimant le V5-tagged wtILK est effectué en utilisant une stratégie de transduction rétrovirale telle que précédemment décrite (Escaffit et al., 2006).

### *2.3 Analyse de protéines par immunobuvardage de type western*

#### *2.3.1 Préparation des extraits protéiques*

Chacun des pétris contenant les cellules à extraire sont préalablement rincées avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) (140 mM de NaCl (Fisher Scientific, Ottawa, On), 3 mM de KCl (Fisher Scientific), 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ ) et 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker)) (pH 7.4) froid (4°C), puis solubilisées dans un tampon Laemmli (2.3 % (m/v) SDS (Sigma-Aldrich, Oakville, On), 10 % glycérol (v/v), 0.001 % bleu de bromophénol dans 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8 additionné de 5 % β-mercaptoéthanol (v/v) (Sigma-Aldrich). Les cellules sont ensuite grattées et transférées dans un Eppendorf, passées 10 secondes au sonicateur, centrifugées à 13 000 rotations par minute pendant 5 minutes, puis chauffées pendant 5 minutes à 95°C. La concentration des protéines dans chacun des échantillons est évaluée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) ou avec le DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Mississauga, ON). Les lysats cellulaires étaient utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

#### *2.3.2 Séparation des protéines et transfert sur membrane*

Des gels séparateurs de types Thomas and Kornberg (Thomas and Kornberg, 1975) de concentrations variant entre 10 et 15 % selon la taille des protéines à analyser sont préalablement préparés. Ensuite des quantités adéquates (de 25 à 100 µg) et équivalentes de protéines sont chargées dans des puits individuels, puis séparées par électrophorèse de type SDS-PAGE (Shapiro et al., 1967) pendant 12 à 16 heures à 60 volts. Ensuite, le gel de polyacrylamide est placé en sandwich contre une membrane de nitrocellulose dans un module de transfert Trans-Blot Cell (Bio-Rad) selon les indications du fabricant. Pour effectuer le transfert, un courant électrique est appliqué dans la chambre réservoir du module pendant 20 minutes à 20 volts, puis de 60 à 90 minutes à 100 volts. Un marqueur de masse moléculaire (Full-Range Rainbow Markers, GE Healthcare, Baie d'Urfée, QC, Canada) de même qu'une coloration au rouge de Ponceau (0.2 % (m/v) rouge de Ponceau (Sigma-Aldrich) dans 20 % d'acide trichloroacétique (Sigma-Aldrich)) sont utilisés afin d'évaluer l'efficacité du transfert et de repérer les zones de la membrane de nitrocellulose à utiliser dans la détection des protéines d'intérêts.

### 2.3.3 Détection des protéines

Les sites non spécifiques de la portion de membrane présentant la protéine d'intérêt sont saturés (blocage) pendant une heure à température de la pièce dans une solution de blocage 5 % (m/v) BLOTTO (5 % de lait en poudre écrémé, 0.01 % (v/v) Tween 20 (Bio-Rad) dans le PBS) ou PBS-BSA 2 % (m/v) (dépendant des caractéristiques de l'anticorps primaire à utilisé). Puis, la membrane est incubée 16 heures à 4°C avec un anticorps primaire spécifique dilué dans la solution de blocage (la liste des anticorps primaires utilisés est fournie dans le tableau 1 à la fin de cette section « Matériels et Méthodes »). Après l'incubation, l'anticorps primaire est enlevé et la membrane est lavée à quatre reprises pendant 10 minutes avec une solution PBS contenant 0.01 % de Tween 20. La membrane est incubée pendant 1 heure à température de la pièce avec un anticorps secondaire spécifique dirigée contre l'espèce ayant produit l'anticorps primaire (c.-à-d., souris, lapin ou rat; tableau 1). Après incubation, l'anticorps secondaire est enlevé et la membrane est de nouveau lavée à quatre reprises pendant 10 minutes avec une solution PBS contenant 0.01 % de Tween 20. Tous les anticorps secondaires (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) utilisés étaient couplés à l'enzyme horseradish peroxidase (HRP). La révélation des protéines d'intérêts était effectuée à l'aide de réactions de bioluminescence produites à l'aide des systèmes Immobilon Western (Millipore, Temucula, CA) ou ECL (GE Healthcare). L'intensité relative des bandes obtenues était évaluée par des analyses densitométriques utilisant le logiciel Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

## 2.4 Isolation de la matrice extracellulaire

### 2.4.1 Récupération des protéines totales de la MEC des cellules en culture

Préalablement à l'expérience, des cellules HIEC transfectées avec le siCNS ou le siILK étaient transférées à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans des pétris de 100 mm, puis les cellules étaient cultivées de routine pendant 48 heures. Les cellules étaient ensuite lysées à température de la pièce pendant 5 minutes à l'aide d'une solution de 27 $\mu\text{M}$  d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4 \text{OH}$ ) dans de l'eau bidistillée. Les lysats sont jetés et la MEC est rincée 10 minutes en rotation avec de l'eau bidistillée avant d'être récupérée dans du tampon Laemmli.

#### *2.4.2 Récupération de la matrice de fibronectine fibrillaire avec le deoxycholate (DOC)*

Cette technique a été adaptée d'une publication par Wierzbicka-Patynowski et coll. (2004) portant sur les méthodes d'analyses spécifiques de la matrice de fibronectine (Wierzbicka-Patynowski et al., 2004). Préalablement à l'expérience, des cellules HIEC transfectées avec le siCNS ou le siILK étaient ensemencées à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans des pétris de 60 mm recouverts ou non de  $3 \mu\text{g}$  par  $\text{cm}^2$  de fibronectine plasmatique humaine (fibronectine exogène; Millipore/Chemicon®, Temucula, CA). Les cellules sont ensuite cultivées pendant 48 heures, puis rincées avec une solution PBS froide. Subséquemment, les cellules sont lysées avec 500  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse deoxycholate (DOC) (2 % (m/v) deoxycholate de sodium (Fisher Scientific), 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 2 mM d'acide iodoacétique (Sigma-Aldrich) et 2 mM de N-ethylmaleimide (Sigma-Aldrich) dans de l'eau nanopure). Puis, les lysats sont transférés dans des Eppendorfs de 1.5 ml, passés à cinq reprises dans une seringue munie d'une aiguille de type 26-G, puis finalement microcentrifugés pendant 20 minutes à 13 000 rpm. Les culots de protéines insolubles au DOC (contient la fibronectine fibrillaire) sont ensuite solubilisés avec 100  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse SDS (1 % SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM d'acide iodoacétique et 2 mM de N-ethylmaleimide dans de l'eau nanopure) puis additionnées de 25  $\mu\text{l}$  de tampon Laemmli. Le volume des échantillons insolubles au DOC à charger pour les analyses en immunobuvardage est estimé en dosant les protéines (avec le DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)) contenues de protéines solubles au DOC des surnageants.

#### *2.4.3 Recouvrement des pétris et des lamelles de verre avec la fibronectine ou le collagène I*

Afin de former un substrat cellulaire exogène de  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine et de  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de collagène I, de la fibronectine plasmatique humaine (Millipore) diluée dans le PBS et du collagène de type 1 de rat (BD Biosciences, Bedford, MA) dilué dans une solution 0,02 N d'acide acétique/eau nanopure étaient incubées pendant 2 heures et à 37 °C dans des pétris ou des lamelles de verre (12 mm de diamètre ; VWR International, Radnor Township, PA). Tous les sites d'adhésion restants sont bloqués avec une solution 2 % BSA (Sigma-Aldrich) dilué dans le

PBS. Plusieurs protéines contenu dans le FBS (e.g., vitronectine, fibronectine) se déposent et/ou adsorbent sur le plastique des pétris et le verre des lamelles et stimule l'adhésion et l'étalement des cellules ensemencées (Hayman et al., 1985). Ainsi, afin de faciliter l'adhésion des cellules sur les lamelles de verre, ces dernières étaient préincubées pendant 2 heures à 37 °C avec du milieu de culture contenant 4 % de FBS (MP Biomedicals).

## *2.5 Immunoprécipitation*

Les cellules étaient solubilisées dans 1 ml de tampon de lyse froid (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, et l'inhibiteur de protéase sans EDTA cOmplete, Mini (Roche Diagnostics)), puis transférées pendant 20 minutes sur la glace. Les lysats sont microcentrifugés à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C, puis, afin d'éliminer les interactions non spécifiques, les culots sont traités avec 100 µl de Protein G-Sepharose™ (Gibco-Invitrogen) pendant 1 heure à 4 °C sous agitation. Les billes Protein G-Sepharose™ sont récupérées par une minicentrifugation rapide et jetées. Les échantillons étaient ensuite incubés avec l'anticorps primaire pendant 16 heures sous agitation et à 4 °C, puis pendant 1 heure avec 30 µl de Protein G-Sepharose™. Les billes Protein G-Sepharose™ étaient récupérées par minicentrifugation, lavées trois fois avec le tampon de lyse. Les protéines du précipitées étaient récupérées avec du tampon Laemmli 2x, puis analysées par immunobuvardage.

## *2.6 Isolation des protéines et des Rho GTPases membranaires*

Les cellules étaient d'abord rincées au PBS froid, incubées dans un tampon de lyse ((250 mM de sucrose (Sigma-Aldrich), 10 mM de Tris pH 7.5, 1 mM de PMSF (Sigma-Aldrich) 1 % d'un mélange commercial d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich)), puis transférées dans un Eppendorf. Après 3 cycles de congélation à l'azote liquide et de décongélation à 37 °C, les échantillons étaient centrifugés à 100 000 x g pendant 1 heure à 4 °C. Les culots obtenus sont lavés avec du tampon de lyse puis resuspendu dans 100 µl de ce tampon additionné de 0,1 % de SDS et 1 % de Triton X-100. Tous les extraits protéiques sont subséquemment analysés par immunobuvardage.

## 2.7 Microscopie

### 2.7.1 Microscopie optique

Après les expériences et/ou les traitements appropriés, les cellules étaient visualisées directement dans le pétri avec un microscope DMIRBE (Leica, Saint-Laurent, QC) équipé pour l'acquisition d'image (RTE/CCD Y/Hz-1300 cooled camera, Princeton Instruments inc., Trenton, NJ). Le logiciel informatique Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp., West Chester, PA) a été utilisé pour mesurer numériquement l'étalement cellulaire.

### 2.7.2 Microscopie par immunofluorescence indirecte sur des tissus intestinaux

Les procédures d'inclusion des tissus intestinaux utilisés pour effectuer des coupes cryogéniques ont été décrites précédemment (Beaulieu, 1992). Brièvement, des coupes cryogéniques de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sur une lame de verre (VWR) sont fixées dans le PBS-paraformaldéhyde 2 % (m/v) (Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes à la température de la pièce ou dans le méthanol (-20 °C) pendant 10 minutes. Trois lavages au PBS de 10 minutes sont effectués suivit d'une incubation des tissus dans une solution de PBS-glycine 100 mM à pH 7.4 pendant 45 minutes à 4°C. Trois autres lavages au PBS de 10 minutes sont effectués, puis les sites d'interactions non spécifiques sont bloqués dans une solution de PBS-BSA 2 % ou 5 % BLOTTO pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les anticorps primaires (tableau 1) sont dilués dans la solution de blocage puis incubés avec les tissus pour une période de 1 heure à température pièce. Les tissus sont ensuite lavés pendant 10 minutes puis incubés (protégés de la lumière) en présence de l'anticorps secondaire spécifique de l'espèce d'origine de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est également dilué dans la solution de blocage. Les anticorps secondaires utilisés sont : chèvre anti-souris et chèvre anti-lapin Alexa Fluor® 488 (1/200) (Gibco-Invitrogen), chèvre anti-souris Alexa Fluor® 594 (1/200) (Gibco-Invitrogen), chèvre anti-souris et chèvre anti-lapin couplés à la rhodamine (1/25) (Chemicon International, Temucula, CA) et finalement, chèvre anti-souris couplé au FITC (1/25) (Chemicon). Suite à l'incubation, les tissus sont lavés 10 minutes puis incubés dans une solution de PBS-DAPI (1 /50 000) (Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes, puis relavés au PBS pendant 5 minutes. Certaines sections ont également été contre

colorées dans une solution de 0.01 % (m/v) bleu Evan (Sigma-Aldrich)-PBS. Les tissus sont ensuite recouverts de 2 à 5 µl de milieu de montage (glycérol : PBS 9/1 + 0,1 % (m/v) de paraphénylenediamine) et d'une lamelle de verre. Les tissus sont visualisés avec un microscope Reichert Polyvar 2 (Leica, Saint-Laurent, QC) équipé pour l'acquisition d'image en épifluorescence (DCFC300FX camera, Leica). Le logiciel Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp.) a été utilisé pour l'acquisition numérique des images.

### *2.7.3 Spécimens de tissu intestinal humain*

Tous les travaux et les spécimens d'iléon humain adulte et fœtal ont été faits et obtenus selon des protocoles approuvés par le Comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke pour les projets: Tissus foetaux: Projet #1997-4,96-38 et Tissus adultes: Projet #1991-17, 90-18. Les segments d'iléons de 20 semaines de gestation ont été obtenus par interruption volontaire de grossesse alors que les segments d'iléons adultes ont été obtenus de tissus sains entourant des résections de l'iléon chez des patients atteints de pathologies intestinales non inflammatoires.

### *2.7.4 Microscopie par immunofluorescence indirecte sur des cellules*

D'abord,  $2.0$  à  $4.0 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  étaientensemencées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre déposées au fond des puits d'une plaque de 12 puits (Starstedt, Montréal, QC). Les procédures touchant la microscopie à immunofluorescence des cellules sont essentiellement les mêmes que celle décrite à la section 2.6.2. Cependant les cellules peuvent avoir à subir une étape de perméabilisations des membranes avec une solution de PBS-Triton X-100 0,2 % pendant 5 minutes, suivit de trois lavages de 10 minutes dans le PBS afin de permettre aux anticorps primaires (Tableau 1) d'atteindre la région cytoplasmique et nucléaire des cellules. Cette étape est ajoutée après le troisième lavage suivant la fixation dans la solution de PBS-paraformaldéhyde 2 % uniquement. De plus, pour marquer le cytosquelette d'actine des cellules simultanément à une protéine d'intérêt, de la phalloïdine conjuguée au TRITC (1 dans 5000) (Chemicon) est ajoutée à la solution de blocage servant à diluer l'anticorps secondaire.



## 2.8 Essai de prolifération cellulaire par incorporation du BrdU

Préalablement à l'expérience, des cellules HIEC ou Caco-2/15 transfectées avec le siCNS ou le siILK sont transférées à une concentration de  $3.0 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans des pétris de 35 mm. Les cellules sont cultivées préconfluentes puis le BrdU (BrdU labelling reagent du In Situ Cell Proliferation Kit Fluos® (Roche Diagnostics)) est ajouté au milieu de culture pour une période de 4 heures (10  $\mu\text{M}$  concentration finale). À terme, les cellules sont rincées au PBS, puis fixées avec du méthanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) pendant 10 minutes. Les cellules fixées sont incubées pendant 8 minutes dans une solution HCl 4N (solution de Xagor, afin de dénaturer la chromatine), puis laver trois fois au PBS et finalement incubées pendant 10 minutes avec la solution de blocage (Blocking reagent di In Situ Cell Proliferation Kit Fluos®). Subséquemment, les cellules sont incubées 60 minutes à  $37^\circ\text{C}$  avec l'anticorps anti-BrdU couplé au FITC (Roche Diagnostics) dilué 1 / 50 dans la solution de blocage, puis lavées trois fois au PBS et incubées 3 minutes dans une solution de PBS-DAPI (1 / 50 000) (Sigma-Aldrich). Un lavage final de 5 minutes avec le PBS est effectué. Finalement, le marquage au BrdU des cellules est visualisé directement dans les pétris avec un microscope DMIRBE (Leica) équipé pour l'acquisition d'image en épifluorescence (DCFC300FX camera, Leica). Le logiciel Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp.) a été utilisé pour l'acquisition numérique des images. Les cellules marquées au BrdU et au DAPI ont été comptées manuellement et l'indice de prolifération a été obtenu en calculant le pourcentage de cellules ayant incorporé le BrdU nombre total de cellules marquées avec le DAPI.

## 2.9 Essais de migration cellulaire

### 2.9.1 Essai de migration par la formation d'une blessure

Préalablement à l'expérience, des cellules HIEC transfectées avec le siCNS ou le siILK sont transférées à une concentration de  $2,5 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans des pétris de 35 mm. Les cellules étaient ensuite cultivées normalement jusqu'à la confluence. Pour les essais de migration, une partie de la couche confluente de cellule est blessée à l'aide d'un morceau de lame de rasoir de 1,5 cm de large. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées pendant

48 heures avec leur milieu de culture additionné de 2 mM concentration finale d'hydroxyurée afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Ce traitement permet l'arrêt de la prolifération cellulaire, et ce, sans affecter la migration (Hamuro et al., 2002). Les cellules sont ensuite fixées, marquées au DAPI et visualisées au microscope. Finalement, les cellules ayant dépassé la marge des blessures étaient comptées manuellement.

### *2.9.2 Essai d'étalement/migration des agrégats cellulaires*

Cet essai a été élaboré afin d'évaluer simultanément les capacités d'étalements et de migration des cellules. Les cellules HIEC traitées avec le siCNS ou le siILK dans des pétris de 100 mm (Falcon) sont d'abord récoltées en utilisant une solution de PBS-EDTA 0,5 mM pendant 15 minutes à 37 °C et ensuite transférées dans un tube de 15 ml (Falcon). Les tubes sont centrifugés pendant 4 minutes à 1000 x g à température pièce. Suivant cette étape, les cellules sont suspendues doucement dans le milieu de culture HIEC additionné de 2 mM d'hydroxyurée (concentration finale) (Hamuro et al., 2002). Pour cette étape, une pipette sérologique à bout large (Starstedt, Montréal, QC) est utilisée de manière à produire des agrégats de moins de 50 cellules. Les cellules sont ensuite transférées dans un pétri pour bactérie (Sarstedt) préalablement prétraité pendant 1 heure à 37 °C avec une solution de PBS-BSA 2 %. Les pétris contenant les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37 °C, période durant laquelle ils sont agités délicatement à tout les 30 minutes. À ce moment les cellules sont transférées dans des pétris de culture de 100 mm (Falcon) préalablement recouverts ou non de 3  $\mu\text{g}$  par  $\text{cm}^2$  de fibronectine exogène et incubées pendant 1 heure à 37 °C. Après cette période, des agrégats d'approximativement 50 à 100 cellules sont repérés avec un microscope inversé M40-82797 (Wild Heerbrugg, Leica) et entourés sur la partie externe du pétri à l'aide d'un crayon marqueur. Après 24 heures, ces agrégats sont photographiés au microscope avec une caméra numérique RS Photometrics (CoolSNAP). L'aire couverte par les agrégats et le nombre de cellules ont été évalués en utilisant le logiciel Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp.) La capacité relative d'étalement/migration représente le ratio de l'aire couverte par un agrégat après 24 heures sur le nombre de cellules formant le même agrégat. Le ratio avec les résultats des cellules contrôles est ensuite multiplié par 100.

### 2.9.3 Essai de restitution cellulaire

Des cellules Caco-2/15 transfectées avec le siCNS ou le siILK étaient ensemencées à très haute densité ( $4.0 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ ) dans des pétris de 35 mm de manière à ce que la confluence de ces deux populations cellulaires expérimentales soit atteinte dans les 12 heures suivant l'ensemencement. Le surlendemain, les monocouches de ces cellules étaient blessées par aspiration avec l'extrémité d'un embout de pipette de 200  $\mu\text{l}$  (0.5-0.6 mm de diamètre) puis les cellules sont rincées au PBS. Subséquemment, les cellules ont été incubées avec du milieu de culture pour Caco-2/15 additionné de 2 mM d'hydroxyurée (concentration finale) (Hamuro et al., 2002) et additionnées (ou non) d'une concentration de fibronectines exogènes équivalentes à  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de la surface des pétris. Les blessures étaient photographiées immédiatement après leur formation, puis 48 heures plus tard, avec un microscope inversé M40-82797 (Wild Heerbrugg, Leica Canada, Toronto) muni d'une caméra numérique RS Photometrics (CoolSNAP, Tucson, AZ). La surface des blessures a été mesurée avec le Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp.). La restitution relative représente le pourcentage de la restitution de la blessure d'origine, c'est-à-dire : l'aire de la blessure après 48 heures divisée par l'aire immédiatement après sa formation (multiplié par 100).

### 2.10 Essai luciférase

L'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF chez des cellules HIEC transfectées avec 40 nM de siCNS (Quiagen) ou de siILK (Applied Biosystems/Ambion) a été vérifié en utilisant les plasmides TOPflash (promoteur actif) (Korinek et al., 1998) et FOPflash (Millipore) (Coghlan et al., 2000). Ces essais ont été effectués chez des cellules HIEC exprimant de façon exogène et stable des constructions de la  $\beta$ -caténine type sauvage ( $\beta$ caténine-wt) ou une forme mutée de la  $\beta$ -caténine (S37A;  $\beta$ caténine-mut) qui inhibe sa dégradation (Morin et al., 1997; Young et al., 1998). Ces cellules ont été générées dans le laboratoire du Pr Beaulieu par l'infection des cellules HIEC natives avec le vecteur d'expression pLNCX2 codant pour la forme sauvage ou mutée de la  $\beta$ -caténine ou encore avec un vecteur pLNCX2 vide servant de contrôle (vecteur vide) selon une stratégie de transduction rétrovirale décrite précédemment (Escaffit et al., 2006; Escaffit et al., 2005b). Pour les expériences, des cellules adhérentes depuis 24 heures au

sein de pétris de 35 mm étaient transfectées simultanément en présence de X-tremeGENE (Roche Diagnostics) avec les siRNA (voir section 2.2.1) et en présence de 2  $\mu$ l de Lipofectamine 2000 (Gibco-Invitrogen) avec 2 ng du vecteur pRL-Luc codant pour le contrôle interne Renilla, avec 0.5  $\mu$ g du plasmide TOPflash ou du plasmide FOPflash. 48 heures après les transfections les cellules étaient récoltées et l'activité luciférase Firefly et Renilla étaient mesurée en utilisant le *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega Corporation) selon les instructions du fabricant. Pour les résultats, les valeurs normalisées obtenues pour les cellules transfectées avec la construction FOPflash étaient soustraites aux valeurs normalisées de l'expérience respective obtenues pour les cellules transfectées avec le plasmide TOPflash.

## *2.11 Réaction en chaîne par polymérase et quantification PCR en temps réel*

### *2.11.1 Réaction d'ARN et transcription inverse (RT)*

L'ARN total des cellules HIEC ou Caco-2/15 transfectées avec les siRNA étaient extraits aux moments appropriés en utilisant le TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) conformément aux instructions du fabricant. La qualité de l'ARN extrait est vérifiée visuellement par U.V sur gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du bromure d'éthidium. Les quantités d'ARN extraites sont mesurées par l'absorbance en spectrophotométrie à la longueur d'onde 260 nm et la pureté par le ratio de l'absorbance 260 nm/280 nm (Pfaffl, 2001). La réaction de transcription inverse a été effectuée telle que décrite précédemment (Ni et al., 2005). 2  $\mu$ g d'ARN sont utilisé avec les amorces oligo(dt) (Amersham) et l'enzyme reverse-transcriptase Omniscript (Qiagen). Il est à noter que pour les expériences sur l'effet de l'inhibition artificielle de l'ILK sur l'expression de marqueurs de différenciation des cellules Caco-2/15 siCNS et Caco-2/15 siILK, les deux populations de cellules transfectées étaientensemencées à très haute densité ( $4.0 \times 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ ) dans des pétris de 35 mm de manière à synchroniser leur confluence au maximum. Ceci avait pour but de minimiser de possibles décalages dans l'initiation du processus de différenciation. De plus, des fractions séparées de l'épithélium et du mésenchyme isolés d'iléons foetaux à l'aide d'une solution non-enzymatique à base d'EDTA (BD Bioscience) (Perreault and Beaulieu, 1998) ont été utilisées pour détecter l'expression des membres du complexe PIP par RT-PCR.

### *2.11.2 Réactions en chaîne par polymérase (PCR)*

Les analyses PCR ont été effectuées telles que précédemment décrites (Ni et al., 2005). Rapidement, dans des tubes à PCR (Bio-Rad), 2 µg d'ADNc sont mélangés avec 2,5 µl de tampon d'amplification 10X (Qiagen), 10 µM de chacune des deux amorces spécifiques (IDT® Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) (la liste des amorces sens et anti-sens utilisées lors des PCR et des qPCR est fournie dans le tableau 2 à la fin de cette section « Matériels et Méthodes »), 200 µM de solution de dNTP (New England Biolabs, Pickering, ON), et 1 µl de Taq polymérase (New England Biolabs). Le volume est ensuite complété à 25 µl avec d'eau nanopure et les tubes sont placés à l'intérieure d'un appareil iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). Les réactions s'effectuent lors de 30 cycles successifs comportant 3 étapes : dénaturations de l'ADN à 94 °C d'une durée de 45 secondes, appariement des amorces à l'ADN à 60 °C d'une durée de 45 secondes et finalement élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 72 °C d'une durée de 60 secondes. L'ADN amplifié par la réaction est ensuite migré sur un sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

### *2.11.3 Quantification PCR en temps réel (qPCR)*

Les quantifications PCR en temps réel ont été effectuées telles que décrites précédemment (Ni et al., 2005). Dans les tubes pour quantification PCR en temps réel à paroi mince (Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 2 µg d'ADNc sont mélangés avec 10 µl de Stratagene Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene/Agilent Technologies), 10 µM de chacune des deux amorces spécifiques (voir le tableau 2 (IDT® Integrated DNA Technologies)). Le volume est ensuite complété à 25 µl avec de l'eau nanopure et les tubes sont placés à l'intérieure d'un appareil MX3000P qPCR Machine (Stratagene/Agilent Technologies). Les réactions s'effectuent lors de 40 cycles successifs comportant 3 étapes : dénaturations de l'ADN à 95 °C d'une durée de 30 secondes, appariement des amorces à l'ADN à 55 °C d'une durée de 30 secondes et finalement élongation de l'ADN à 72 °C d'une durée de 60 secondes. La fluorescence produite après chaque phase d'appariement est acquise par l'appareil et les valeurs seuils (Cycle threshold - Ct) sont calculées automatiquement par le logiciel MxPro qPCR Software (Stratagene/Agilent Technologies). Les valeurs seuils Ct correspondent au nombre de

cycles nécessaire afin que le signal de fluorescence de la réaction franchisse le signal de fluorescence en bruit de fond de cette même réaction. Ainsi une valeur seuil Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN ciblée par la réaction (Pfaffl, 2001). Suivant la réaction d'amplification qui servent à calculer les valeurs seuils Ct, l'appareil effectue plusieurs mesures successives en soumettant les tubes à une augmentation graduelle de la température de 55 °C à 95 °C. Cette étape permet de vérifier à quelle température les doubles brins d'ADN du produit de la réaction se dissocient. Comme le Stratagene Brilliant II SYBR® émet de la fluorescence uniquement lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, pour une paire d'amorces spécifique la fluorescence d'un seul produit de réaction diminuera dans un intervalle unique et rapproché de température. De plus, certains paramètres doivent être pris en compte afin d'obtenir une quantification relative exacte des gènes d'intérêts. Premièrement, l'efficacité d'amplification d'une réaction dépend du transcrit d'origine à quantifier et des amorces spécifiques utilisées. Pour obtenir l'efficacité d'une réaction, une courbe standard est produite avec les valeurs seuils Ct obtenues pour 5 dilutions 1/5 de l'ADNc provenant de la condition contrôle (10 µg, 2,0 µg, 0,4 µg, 0,08 µg, 0,016 µg) en fonction du logarithme de la quantité en µg de ces 5 dilutions d'ADNc. C'est la valeur de la pente obtenue par cette courbe standard qui détermine la valeur de l'efficacité de la réaction. Afin de minimiser les variables expérimentales et de maximiser la portée scientifique des comparaisons, seules les réactions ayant des valeurs entre 0,8 et 1,2 sont utilisées pour les calculs servant à la quantification relative des transcrits. Deuxièmement, la quantité d'expression d'un gène est variable en fonction de plusieurs facteurs (e.g. différenciation). Afin de pouvoir comparer les variations de l'expression de notre gène cible, les quantités de transcrits d'origines de ce gène doivent être comparées à un gène de référence dont l'expression a été démontrée pour être stable dans différentes conditions (Dydenborg et al., 2006; Pfaffl, 2001). Le gène RPLPO a donc été utilisé comme gène de référence pour les calculs (Dydenborg et al., 2006). Ces deux paramètres pris en compte permettent de quantifier notre gène cible selon le modèle mathématique de Pfaffl (2001).

$$\text{Quantité relative du gène cible} = \frac{(\text{Efficacité}_{\text{cible}})^{\Delta \text{ct gène cible siCNS-siILK}}}{(\text{Efficacité}_{\text{réf.}})^{\Delta \text{ct gène réf. siCNS-siILK}}}$$

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires

anticorps primaire de souris/ spécifications	fabricant	technique(s) utilisée(s) et dilution(s)
PINCH/clone 49	BD Transduction Laboratories	WB: 1/1000, IF: 1/50, IP: 1/50 (2 µg/pétrie de 100mm)
β-actine/clone C4	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)	WB: 1/ 75 000
FAK/clone 77	BD Transduction Laboratories	WB: 1/1000
fibronectine/ HFN 7.1	Developmental Studie Hybridoma Bank (DSHB) (Iowa City, IA)	WB: 1/500 , IF: 1/50 (PBS- BSA2%)
vinculine/clone 7F9	Millipore/Chemicon®	IF: 1/500 (PBS-BSA2%)
paxilline	BD Transduction Laboratories	WB: 1/1000, IF: 1/50
pRB/clone G3-245	BD Pharmingen (San Diego, CA)	WB: 1/1000
V5 Tag	Invitrogen	WB: 1/1000, IF: 1/500
α-parvin/3B5	fourni généreusement par Dr C.Wu (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA)	WB: 1/10, IF: 1/2
β-parvin/11A5	fourni généreusement par Dr C.Wu	WB: 1/300, IF : 1/50
HA-probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Co-IP: 1/50 (2 µg/pétrie de 100mm)
RhoA/26C4	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	WB:1/100
Rac1	BD Transduction Laboratories	WB:1/1000
Cdc42	BD Transduction Laboratories	WB:1/250
β-tubuline	Millipore/Chemicon®	WB:1/1500
tensin1	fourni généreusement par Dr S.H. Lo (University of California-Davis, Sacramento, CA)	WB:1/1000, IF:1/100 (BSA 2%)
ILK/clone 3	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ)	WB: 1/1000, IF: 1/100

WB : Immunobuvardage de type western  
IF : Immunofluorescence  
IP : immunoprécipitation

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires (suite)

<b>Anticorps primaires de lapin/spécifications</b>	<b>fabricant</b>	<b>technique(s) utilisée(s) et dilution(s)</b>
laminine chaîne $\beta 1\gamma 1$	Sigma-Aldrich	WB: 1/1000, IF: 1/200
intégrin $\alpha 5$ /AB1928	Millipore (Temucula, CA)	WB: 1/1000, IF: 1/100
intégrin $\alpha V$ /AB1930	Millipore	WB: 1/1000
p21	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	WB: 1/2000
p27	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	WB: 1/2000
cyclin D1/D2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	WB: 1/5000
chaîne légère de la myosine (MLC2)/3672	Cell Signalling Thecnology®(Danvers, MA)	WB: 1/1000
pS19 <sup>MLC2</sup> / 3671	Cell Signalling Thecnology®	WB: 1/1000 (PBS-BSA2%)
<b>anticorps primaires de rat/spécifications</b>		
intégrin $\beta 1$ / mAB13	fourni généreusement par le Dr K. Yamada (National Institute of Health /NIDCR, Bethesda, MD)	WB: 1/1000
intégrin $\alpha 5$ /mAB16	Dr K. Yamada	IF: 1/100

WB : Immunobuvardage de type western  
 IF : Immunofluorescence  
 Co-IP : Co-immunoprécipitation



Tableau 2 : Liste des amorces sens et anti-sens pour les PCR et les qPCR

<b>gène</b>	<b>amorce sens</b>	<b>amorce anti-sens</b>	<b>application(s)</b>
ILK	5'-AAGGTGCTGAAGGTTGAGA-3'	5'-ATACGGCATCCAGTGTGTGA-3'	PCR,qPCR
$\alpha$ -parvine	5'-CAATTCGACTCCCAGACCAT-3'	5'-TGGTCGAACAAGGTGTCAAA-3'	PCR
$\beta$ -parvine	5'-AGGTCCTCCTCGACTGGATT-3'	5'-ACCGTCTGCAGCTTCTGT TT-3'	PCR
PINCH-1	5'-TCCCAAGCCCTGATAACAAC-3'	5'-GGGCAAAGAGCATCTGAAAG-3'	PCR
Vimentine	5'-AGATGGCCCTTGACATTGAG-3'	5'-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3'	PCR
E-cadherine	5'-CCTTCCTCCCAATACATCTCCC-3'	5'-TCTCCGCCTCCTTCTTCATC-3'	PCR
RPLP0	5'-GCAATGTTGCCAGTGTCTG-3'	5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAA-3'	PCR,qPCR
Fibronectine	5'-GTTGTTACCGTGGGCAACTC-3'	5'-CTGACGGTCCCACTTCTCTC-3'	qPCR
Chaîne $\beta$ 1 laminine	5'-GGAACAGCTCTCCAAGATGG-3'	5'-CTGCTTCAATGCTGTCCAAA-3'	qPCR
DPPIV	5'-AAGTGGCGTGTTCAGTGTG-3'	5'-CAGGGCTTTGGAGATCTGAG-3'	qPCR
Villine	5'-GGCCAGCCAAGATGAAATTA-3'	5'-CTCAAAGGCCTTGGTGGTGT-3'	qPCR
Sucrase-isomaltase	5'-GAGGACACTGGCTTGGAGAC-3'	5'-ATCCAGCGGGTACAGAGATG-3'	qPCR

Tableau 3 : Liste des inhibiteurs pharmacologiques

Pour certaines expériences les cellules HIEC ont été traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques selon les spécifications indiquées dans la section « résultats ».

<b>enzyme</b>	<b>inhibiteur et concentration utilisé</b>	<b>fabricant</b>
ROCK	Y-27632, 20 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
MLCK	ML-7, 10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
Src/SFK	PP2, 20 $\mu$ M	Calbiochem (San diego, Ca)
PI3-K	LY294002, 30 $\mu$ M	Calbiochem
MEK1/2	PD98059, 20 $\mu$ M	Calbiochem
p38 $\alpha$ / $\beta$	SB203580, 20 $\mu$ M	Calbiochem

## Résultats

### 3.1 *Caractérisation de l'expression de l'ILK chez les cellules épithéliales intestinales humaines*

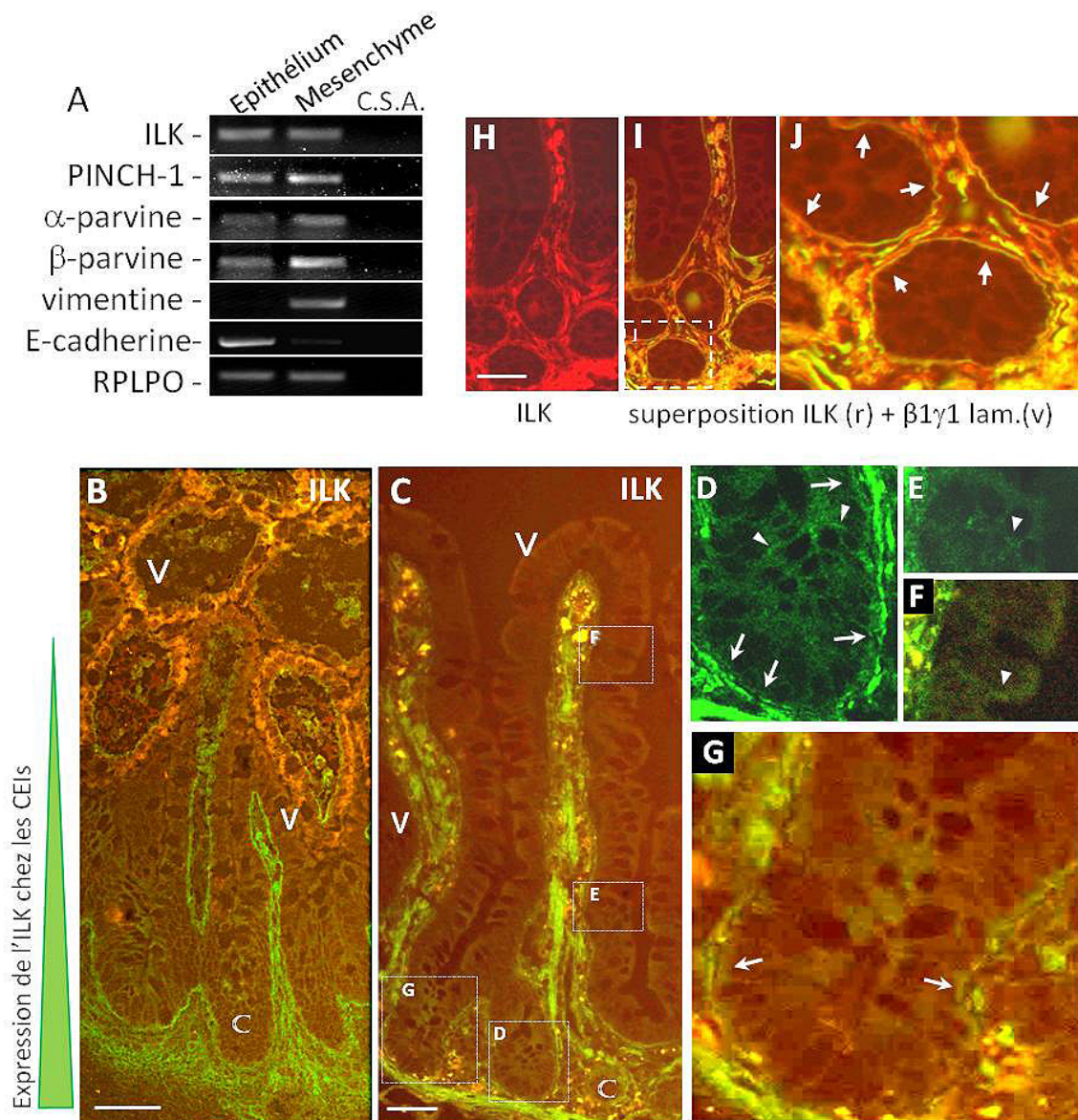
#### 3.1.1 *Expression et distribution des membres du complexe PIP chez les cellules épithéliales de l'axe crypte-villosité intestinal*

Nous avons entamé nos recherches par l'étude de l'expression de l'ILK et de ses partenaires du complexe PIP chez les cellules épithéliales intestinales *in vivo*. Pour commencer, des analyses en RT-PCR sur des fractions isolées de l'épithélium et du mésenchyme de la muqueuse intestinale humaine ont permis de détecter l'ARN messager (ARNm) de l'ILK, de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine dans les deux fractions (Figure 6A). Par contre, PINCH-2 n'a pas été détecté lors de ces analyses (données non présentées) ce qui s'accorde avec les travaux de Braun et coll. (2003) chez la souris rapportant que cette forme de PINCH n'est pas exprimée au niveau de l'épithélium et du mésenchyme de l'intestin (Braun et al., 2003). La pureté des fractions isolées utilisées pour les RT-PCR a été confirmée par la détection réciproque de la E-cadhérine dans la fraction épithéliale et de la vimentine dans la fraction mésenchymateuse (Figure 6A).

Ensuite, nous avons caractérisé la distribution de l'ILK dans la muqueuse de l'intestin grêle humain. Des analyses en microscopie par immunofluorescence (immunofluorescence) ont été effectuées sur des cryosections d'intestins fœtaux (mi-gestation) et adultes (provenant de segments sains de résections) humains. Les immunofluorescences confirment que l'ILK est exprimée fortement au niveau du mésenchyme de l'intestin fœtal (Figure 6B), ainsi que chez les cellules de muscle lisse de la *muscularis mucosae* et les éléments cellulaires de la *lamina propria* (p. ex. cellules endothéliales, myofibroblastes sous-épithéliaux) de l'intestin adulte (Figure 6C). L'ILK est également détectée au niveau de la membrane basolatérale des CEIs de l'intestin fœtal et adulte selon un marquage basolatéral discontinu qui est plus marqué à l'interface du pôle basal des cellules et de la lame basale sous-jacente (Figures 6B et 6C). Le marquage basal de l'ILK chez les CEIs de l'intestin fœtal et adulte est détecté plus intensément au niveau de la portion inférieure des cryptes (Figures 6B, 6C 6D et 6G). Ce marquage diminue chez les CEIs progressant à proximité de l'interface crypte/villosité, et ce, jusqu'à ce qu'il soit détecté

Figure 6 : Expression et distribution de l'ILK chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine

(A) Analyses en RT-PCR de l'ARNm de l'ILK, de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine sur des fractions isolées d'épithélium et de mésenchyme d'intestin foetal humain. Chacune de ces protéines est détectée dans les deux fractions isolées. La pureté des fractions a été vérifiée par l'analyse de l'expression de la vimentine et de l'E-cadhérine. Le gène RPLPO a été utilisé comme contrôle des quantités initiales de matériels utilisés pour les amplifications par PCR et des PCR sans amorce (C.S.A.) ont permis de confirmer la spécificité de l'amplification des gènes ciblés par PCR. (B et C) Photos d'immunofluorescence représentatives de la détection de l'ILK effectuée sur des cryosections d'intestin grêle humain (B) foetal et (C) adulte. (D à G) Agrandissements des zones encadrées correspondantes en C. L'ILK est principalement détectée au niveau des pôles membranaires basaux (ex. pointés par les flèches) et latéraux (ex. pointés par les têtes de flèches) des CEIs des cryptes. (H à J) (H) Images représentatives de la distribution de l'ILK dans les cryptes. (I) Codétection de l'ILK (en rouge) et de la chaîne  $\beta 1\gamma 1$  des laminines de la lame basale (en vert). (J) Agrandissement de la zone encadré en I, les flèches pointent les régions montrant clairement la détection de l'ILK chez les cellules épithéliales. Barres d'échelle : B, C et H : 50  $\mu$ m.



**Figure 6**

faiblement chez les CEIs villositaires de l'intestin fœtal (Figure 6B) et qu'il cesse d'être détecté chez les CEIs des deux derniers tiers des villosités de l'intestin adulte (Figures 6C et 6E). L'ILK est de plus détectée selon un marquage plus faible au niveau des membranes apicales des CEIs de la demi-inférieure des cryptes fœtales (Figure 6B) et adultes (Figures 6C, 6D et 6G) (à l'exception des cellules de la base de ce compartiment), de même encore plus faiblement chez certaines des CEIs villositaires uniquement (Figures 6E et 6F).

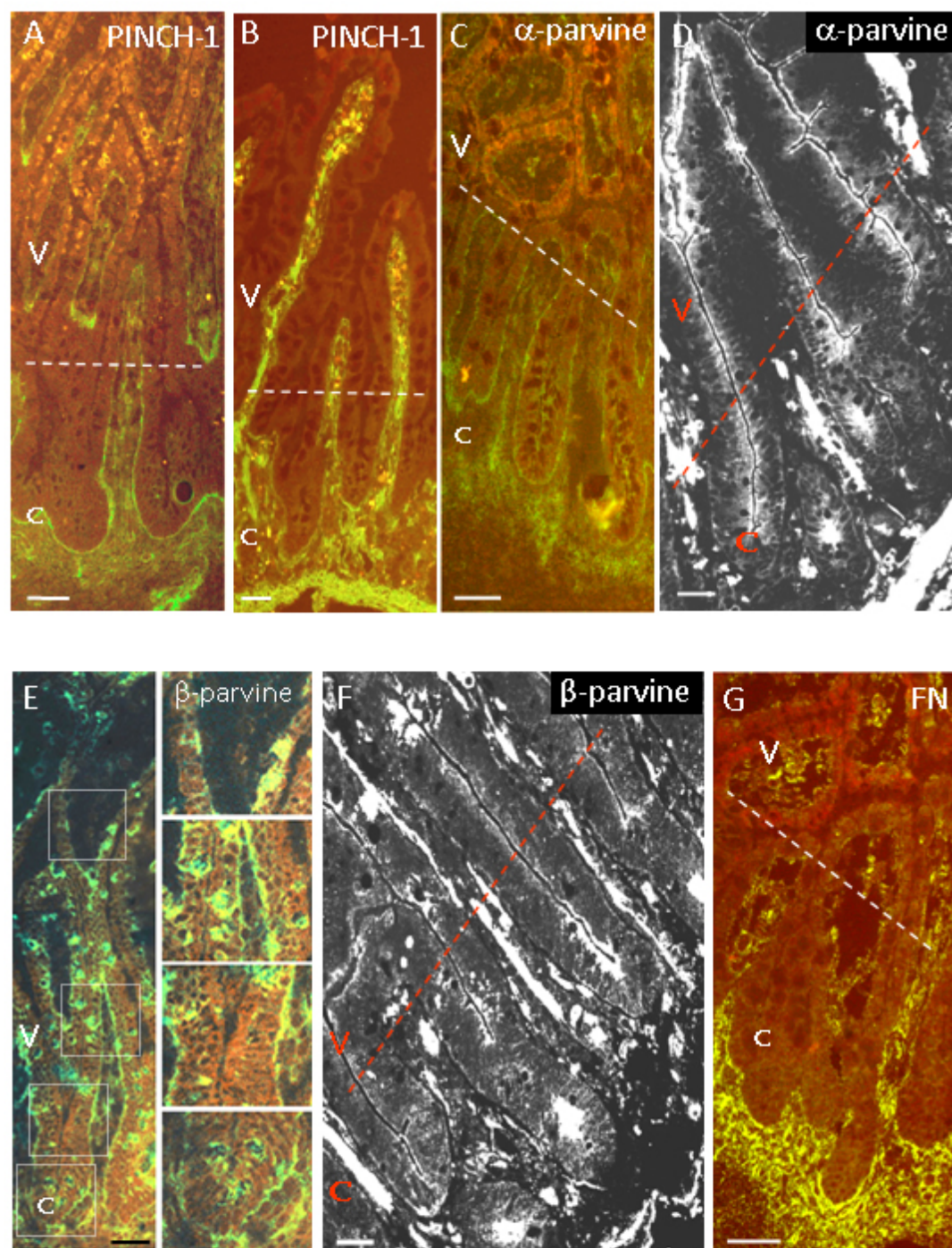
Nous avons également vérifié la position exacte du marquage de l'ILK détecté à la base des CEIs afin de s'assurer de son origine épithéliale. La distribution de l'ILK (Figure 6H) a donc été comparée avec celle de la chaîne  $\beta 1 \gamma 1$  des laminines en immunofluorescence (Beaulieu, 1997). La superposition du marquage de ces deux protéines montre que le marquage de l'ILK et de la laminine se chevauchent à l'interface de la base des CEIs et de la lame basale (Figures 6I et 6J). Toutefois, seule l'ILK est détectée du côté interne et épithélial de cette superposition, ce qui indique que ce marquage de l'ILK est localisé au niveau du pôle basal du domaine membranaire basolatéral des CEIs.

La distribution des protéines PINCH-1,  $\alpha$ -parvine et  $\beta$ -parvine chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine a également été analysée par immunofluorescence. Dans ce cas, les niveaux d'expression et la distribution de PINCH-1 chez les CEIs de l'axe crypte-villosité fœtal (Figure 7A) et adulte (Figure 7B) est très similaires à ce qui est observé pour l'ILK à ces deux stades de la maturation intestinale (Figures 6B et 6C). La distribution de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine à la base des CEIs de l'axe crypte-villosité fœtal (Figures 7C et 7E) et adulte (Figures 7D et 7F) est également comparable à ceux de l'ILK aux mêmes stades du développement intestinal (Figures 6B et 6C). Toutefois, dans l'intestin adulte, la  $\beta$ -parvine (Figures 7F) est également détectée plus fortement à l'interface latérale des CEIs de la demi-inférieure du compartiment cryptal (à l'exception de celles de la base). De plus, les anticorps contre l' $\alpha$ -parvine (Figure 7D) et la  $\beta$ -parvine (Figures 7F) détectent ces protéines aux pôles apicaux, de même qu'à l'interface juxtamembranaire apicolatérale des CEIs de tout l'axe crypte-villosité (à l'exception des CEIs de la base des cryptes). Cependant, puisqu'il est connu que certains anticorps interagissent avec les molécules du glycocalyx présent du côté luminal des CEIs (Holmes and Lobley, 1989; Leusch et al., 1990), nous ne pouvons confirmer la spécificité de ce marquage apical par les anticorps dirigés contre l' $\alpha$ -parvine et la  $\beta$ -parvine. Finalement, il est pertinent de souligner que le gradient distribution des membres du complexe PIP plus forte à

Figure 7 : Distribution de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine

(A-F) Photos d'immunofluorescence représentatives de la distribution de (A et B) PINCH-1, (C et D) de l' $\alpha$ -parvine et (E et F) de la  $\beta$ -parvine effectuée sur des cryosections d'intestin grêle humain (A,C et E) fœtal et (B,D et F) adulte. La distribution de PINCH-1 chez les CEIs de la muqueuse intestinale fœtale et adulte et des parvines chez les CEIs de la muqueuse fœtale se compare à la distribution de l'ILK aux stades équivalents. Les parvines sont détectées plus fortement du côté apical des CEIs. (G) Photo d'immunofluorescence représentative de la fibronectine dans la MEC intestinale. La distribution de la fibronectine se compare à celles des membres du complexe PIP à la base des CEIs de l'axe crypte-villosité. (A-F) Les cryptes et le commencement approximatif des villosités sont respectivement identifiés par les lettres C et V sur les photos d'immunofluorescence. Barre d'échelle : A-G : 50  $\mu$ m.





**Figure 7**

la base des CEIs des cryptes et qui régresse rapidement chez les CEIs des villosités est analogue à celui de la fibronectine dans la lame basale et dans la MEC de la *lamina propria* intestinale (Figure 7G). Dans l'ensemble, ces résultats s'accordent avec le fait que l'expression de l'ILK soit rapportée pour stimuler l'expression et l'assemblage de la fibronectine chez les cellules épithéliales (Wu et al., 1998).

### 3.1.2 Caractérisation des membres du complexe PIP chez les modèles cellulaires HIEC et Caco-2/15

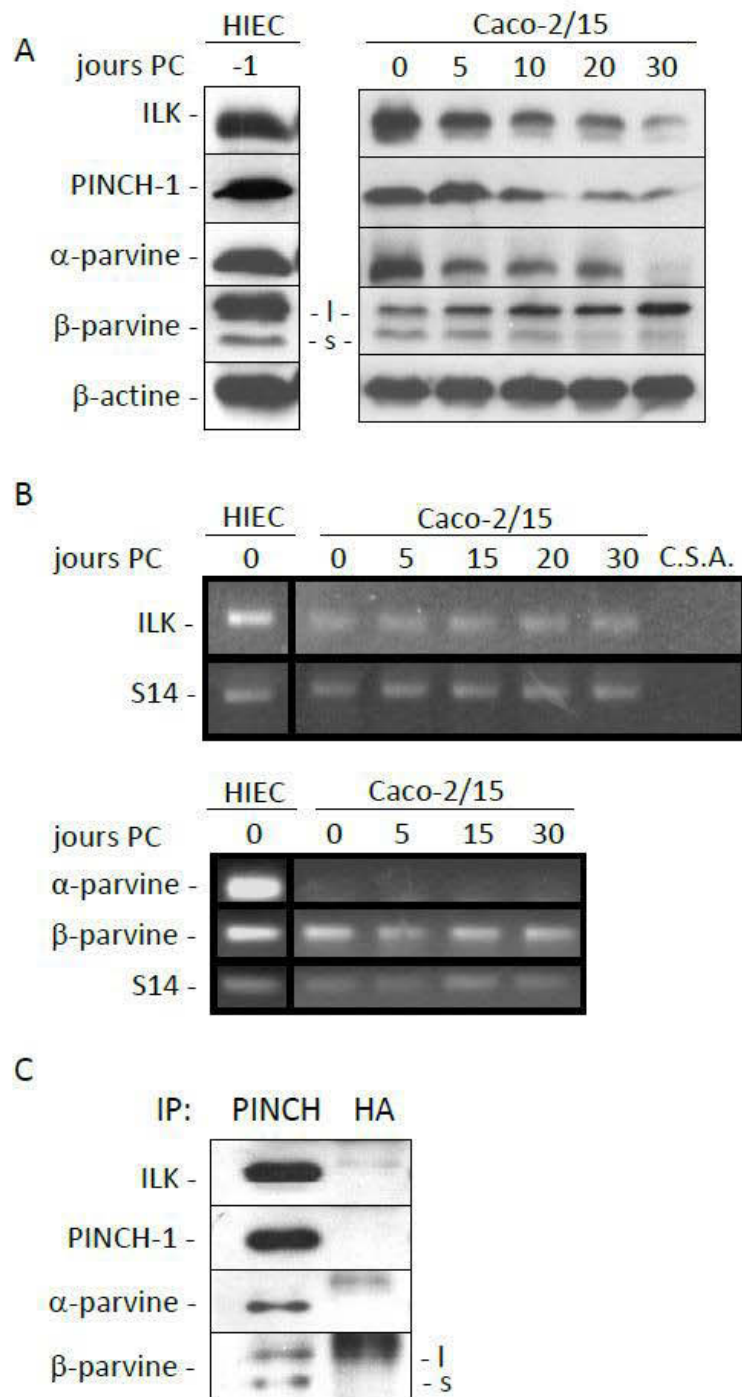
La caractérisation de l'expression et de la distribution cellulaire de l'ILK et de ses partenaires du complexe PIP a également été effectuée chez le modèle cellulaire HIEC des CEIs prolifératives et indifférenciées de la crypte et le modèle de différenciation entérocytaire Caco-2/15 (Pageot et al., 2000; Tremblay et al., 2006). Le processus de différenciation des cellules Caco-2/15 s'amorce spontanément lorsque ces cellules atteignent la confluence et il se complète entre le 25<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jour de culture à postconfluence (PC), c'est-à-dire lorsque les cellules formant une monocouche sont uniformément différenciées (Tremblay et al., 2006; Vachon and Beaulieu, 1992).

Des analyses par immunobuvardage chez les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 révèlent que les niveaux protéiques les plus élevés de l'ILK, PINCH-1 et de l' $\alpha$ -parvine sont détectés chez les cellules HIEC (Figure 8A; HIEC) et les populations nouvellement confluentes de cellules Caco-2/15 (Figure 8A; Caco-2/15 jours 0 PC). À l'opposée les niveaux les plus bas de ces protéines sont observés chez les populations de cellules Caco-2/15 uniformément différenciées (Figure 8A; Caco-2/15 jours 30 PC). Cette diminution des membres du complexe PIP s'effectue de façon progressive durant le processus de différenciation des cellules Caco-2/15 (Figure 8A; Caco-2/15 jours 5, 10, 20 PC). L'analyse densitométrique et la comparaison des bandes d'immunobuvardages des membres du complexe PIP chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (jour 0 vs jour 30 PC) confirment la forte diminution des niveaux protéiques de l'ILK ( $68.9 \pm 6.6 \%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ), de PINCH-1 ( $70.7 \pm 10.0 \%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ) et de l' $\alpha$ -parvine ( $63.9 \pm 7.2 \%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ) chez les cellules Caco-2/15 uniformément différenciées (Gagne et al., 2010). Dans l'ensemble, ces résultats s'accordent avec nos observations chez les CEIs de la muqueuse intestinale humaine. L'anticorps 11A5 qui est dirigé



Figure 8 : Expression de l'ILK, PINCH-1 et des parvines chez les cellules HIEC et Caco-2/15

(A) Immunobuvardages représentatifs de l'ILK, PINCH-1, l' $\alpha$ -parvine et la  $\beta$ -parvine effectués sur des lysats de cellules HIEC et de cellules Caco-2/15 récupérées à différents jours après l'atteinte de la confluence (PC). Les niveaux les plus élevés de ces protéines sont détectés chez les cultures de CEIs indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 jour 0 PC) et à leur plus bas chez les cellules Caco-2/15 uniformément différenciées (jour 30 PC). La  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation protéique. (B) Analyses en RT-PCR des niveaux d'ARNm de l'ILK, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez les cellules HIEC prolifératives et chez les cellules Caco-2/15 à différents jours PC. Nos analyses révèlent une forte expression de l'ARNm de l'ILK, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez les cellules HIEC. Les niveaux d'ARNm de l'ILK et de la  $\beta$ -parvine sont relativement stables durant le processus de différenciation des cellules Caco-2/15. Cependant, il n'a pas été possible de détecter l' $\alpha$ -parvine par RT-PCR chez les cellules Caco-2/15 avec les amorces utilisées (Tableau 2). L'expression de S14 a été utilisée comme gène normalisateur. Des PCR sans amorce (C.S.A.) ont permis de confirmer la spécificité de l'amplification des gènes ciblés lors des PCR. (C) Immunobuvardages représentatifs des membres du complexe PIP détectés à partir de l'immunoprécipitation (IP) de PINCH-1 avec un anticorps contre PINCH (BD Transduction Laboratories) chez les cellules HIEC. L'ILK, l' $\alpha$ -parvine et les deux isoformes de  $\beta$ -parvine co-immunoprécipitent avec PINCH, mais non avec l'anticorps HA-probe (Santa Cruz Biotechnology) utilisé comme contrôle. Cela confirme que chacune de ces protéines participe à la formation d'un complexe protéique commun chez ce type cellulaire.



**Figure 8**

contre la  $\beta$ -parvine reconnaît trois bandes chez les cellules HIEC et deux bandes chez les cellules Caco-2/15 (Figures 8A). Or, cet anticorps 11A5 a précédemment été décrit comme reconnaissant des bandes non spécifiques au-dessus du poids moléculaire théorique de 42 kilodaltons (kDa) de l'isoforme -l de la  $\beta$ -parvine (Zhang et al., 2004) et d'autre part quatre isoformes connues de la  $\beta$ -parvines ont été décrites dans la littérature ( -ss, -s, -l et -B3) (Sepulveda and Wu, 2006). Considérant ces informations nous en sommes venus à identifier la  $\beta$ -parvine-l (Figure 8A; Caco-2/15  $\beta$ -parvine (identifiée par -l) bande du milieu chez les cellules HIEC et bande du haut chez les cellules Caco-2/15) et la  $\beta$ -parvine-s (Figure 8A; Caco-2/15  $\beta$ -parvine (identifiée par -s) bande du bas) comme étant les isoformes de la  $\beta$ -parvine plausiblement détectées chez les cellules HIEC et Caco-2/15. L'analyse densitométrique et la comparaison des bandes d'immunobuvardages de la  $\beta$ -parvine chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (jour 0 vs jour 30 PC) démontrent une augmentation substantielle de la  $\beta$ -parvine-l ( $260.1 \pm 64.0 \%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n \geq 3$ ), ainsi qu'une diminution de la  $\beta$ -parvine-s comparable à celles des autres membres du complexe PIP ( $62.0 \pm 8.8 \%$ ,  $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ) (Figure 8A) au cours du processus de différenciation de ces cellules (Gagne et al., 2010). Ces résultats indiquent qu'il existe des distinctions dans la régulation de l'expression et/ou des niveaux protéiques des isoformes de la  $\beta$ -parvine selon le contexte cellulaire des Caco-2/15. De plus, ils suggèrent que contrairement à la  $\beta$ -parvine-s, la  $\beta$ -parvine-l serait régulée de façon indépendante de celle des autres membres du complexe PIP durant le processus de différenciation de ces cellules.

Nous avons également analysé les niveaux d'ARNm de l'ILK et des parvines chez les cellules HIEC et au cours du processus de différenciation des cellules Caco-2/15. Des analyses par RT-PCR démontrent une expression robuste des transcrits d'ARNm de l'ILK, l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez les cellules HIEC (Figure 8B). Ensuite, contrairement à ce que nous avons observé pour les niveaux protéiques, les niveaux d'expression du messager de l'ILK demeurent relativement stables chez les cellules Caco-2/15 PC (Figure 8B; Caco-2/15 ILK jours 0, 5, 15, 30 PC). Des analyses par qPCR ont également permis de confirmer que les niveaux d'ARNm de l'ILK sont comparables chez les cellules Caco-2/15 nouvellement confluentes et confluentes depuis six jours (qPCR;  $96.5 \pm 25.3 \%$  du niveau au 6<sup>e</sup> jour PC vs jour 0 PC,  $p < 0.05$ ,  $n \geq 3$ ). Ces résultats indiquent donc que la baisse progressive des niveaux protéiques de l'ILK au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 ne peut s'expliquer — du moins totalement — par la régulation négative de l'expression de son gène. Des analyses par RT-PCR indiquent également

que comparativement aux cellules Caco-2/15 nouvellement confluentes, l'expression de l'ARNm totale de la  $\beta$ -parvine diminue lors des premières étapes du processus de différenciation de ces cellules (Figure 8B; Caco-2/15  $\beta$ -parvine jour 5 PC vs jour 0 PC). Néanmoins, l'expression totale du gène de la  $\beta$ -parvine demeure relativement stable et robuste durant ce même processus (Figure 8B; Caco-2/15  $\beta$ -parvine jours 5, 15 et 30 PC). Il est à noter que les amorces utilisées pour détecter la  $\beta$ -parvine cible l'ARNm provenant des deux sites alternatifs d'initiation de la transcription responsables de l'expression des isoformes s et l de la  $\beta$ -parvine (Sepulveda and Wu, 2006). Étonnamment, les amorces qui ont permis la détection de l' $\alpha$ -parvine en RT-PCR chez les cellules HIEC ne nous ont pas permis de détecter l'ARNm de cette protéine chez les cellules Caco-2/15 (Figure 8B). Néanmoins, l'expression de l' $\alpha$ -parvine chez les cellules de la lignée Caco-2 a été confirmé au préalable par d'autres travaux de recherches (Tremblay et al., 2006; Wang and Basson, 2009; Zhang et al., 2004). Dans ce cas, les données supplémentaires provenant de l'article de Tremblay et coll. (2007) indiquent une diminution d'environ 44 % de l'ARNm de ce membre du complexe PIP au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 (Caco-2/15 sous-confluentes vs jour 25 PC) (Tremblay et al., 2006). Cette diminution de l'expression du gène de l' $\alpha$ -parvine ne semble toutefois pas suffisante pour expliquer les faibles niveaux de cette protéine que nous avons détectées chez les cellules Caco-2/15 uniformément différenciées (jour 30 PC). Nos résultats en PCR tendent donc à démontrer dans l'ensemble que la baisse des protéines de l'hétérotrimère PIP chez les cellules Caco-2/15 en différenciation et différenciées serait due — au moins en partie — par un ou des mécanismes de régulation post-traductionnelle de l'expression de ces protéines. Par ailleurs, l'immunoprécipitation de PINCH-1 avec un anticorps dirigé contre PINCH chez les cellules HIEC a permis de coimmunoprécipiter des quantités similaires (détectées par immunobuvardage) de l'ILK et de l' $\alpha$ -parvine (Figure 8C), ainsi que des quantités légèrement inférieures, mais comparables entre elles des deux isoformes de la  $\beta$ -parvine (Figure 8C). Un anticorps monoclonal contre le marqueur moléculaire HA (Santa Cruz Biothecnology) du même sous-type (IgG<sub>2a</sub>) a permis de confirmé la spécificité de l'immunoprécipitation de PINCH-1 par l'anticorps contre PINCH (BD Transduction Laboratories) (Figure 8C). Ces derniers résultats confirment donc la formation du complexe PIP chez les CEIs en culture.

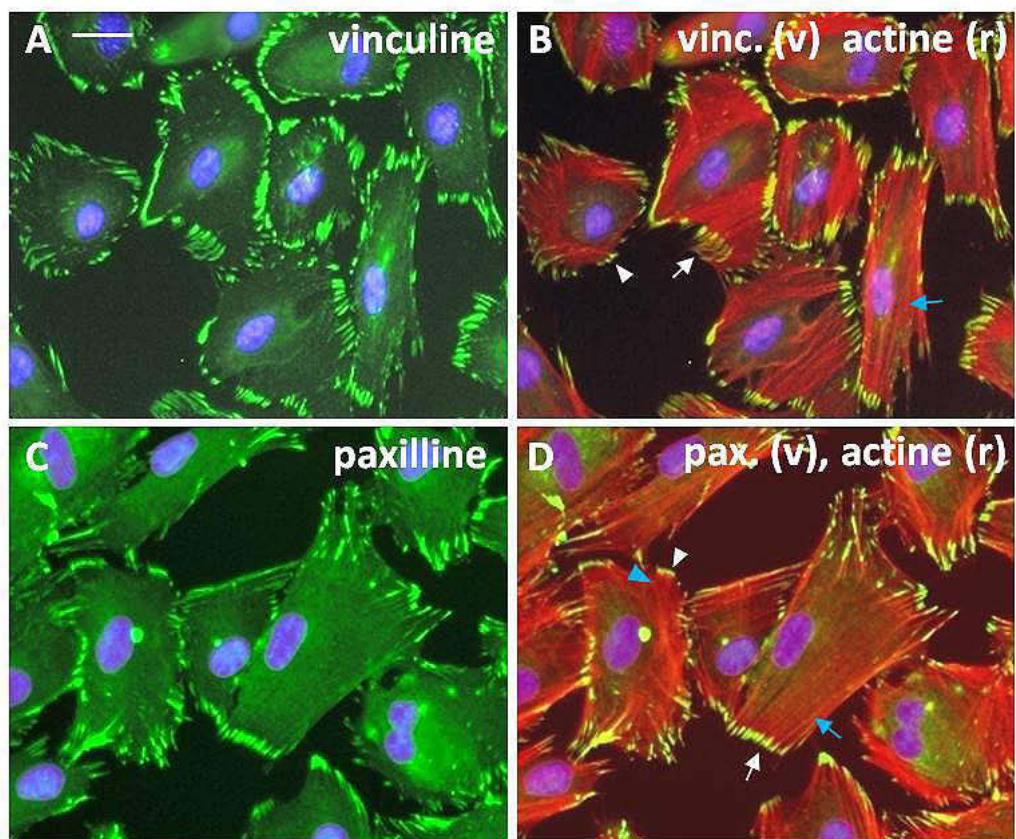
Puisque le complexe PIP est un constituant de l'axe MEC-intégrine-actine (McDonald et al., 2008; Wickstrom et al., 2010b), nous avons caractérisé l'organisation des structures

d'adhésion cellule-MEC (p. ex. FX, FA) des cellules HIEC cultivées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture contenant 4 % de sérum FBS (afin de favoriser l'adhésion initiale des cellules aux protéines du sérum déposées sur le verre) (Hayman et al., 1985). Dans ce but, nous avons analysé par immunofluorescence la distribution de la vinculine et la paxilline qui sont deux protéines importantes des FAs. La paxilline est notamment connue pour interagir directement avec l'ILK et les parvines dans les FAs (Fukuda et al., 2009; Nikolopoulos and Turner, 2002). De façon générale, les images provenant des immunofluorescences de la vinculine montrent que plusieurs FAs marqués par la vinculine (Figure 9A) et la paxilline (Figure 9C) sont détectés en périphérie des cellules HIEC. La codétection des microfilaments d'actine par la phalloïdine (protéine non immune, c.-à-d. une toxine se liant à l'actine-F et qui empêche sa dépolymérisation (Barden et al., 1987)) liée au fluorochrome TRITC (phalloïdine – TRITC, Millipore/Chemicon®) chez ces mêmes cellules révèle que bien que certaines des cellules HIEC présentent une portion de fibres de stress dorsales et d'arcs transverses, la majorité présentent plusieurs fibres de stress ventrales parallèles et une organisation de l'axe intégrine-actine représentative du phénotype cellulaire contractile de type fibroblastique (Figures 9B et 9D) qui est habituellement observé lorsque ces cellules sont cultivées à sous-confluence (Perreault and Beaulieu, 1996). Dans ce cas, les FAs matures (de type tardif) plus imposants sont localisés à l'extrémité des fibres de stress ventrales, alors que les FAs immatures (de type précoce) moins développés sont associés aux fibres de stress dorsales (Figures 9B et 9D).

Nous avons de plus analysé la distribution cellulaire de chacun des membres du complexe PIP chez des cellules HIEC cultivées sur des lamelles de verre prétraitées. Les signaux d'immunofluorescence de l'ILK (Figures 10A et 10B), de PINCH-1 (Figures 10C et 11A), de l' $\alpha$ -parvine (Figures 10C et 11C) et de la  $\beta$ -parvine (Figures 10D et 11E) chez les cellules HIEC sont globalement comparables avec ceux de la vinculine et de la paxilline. Ces résultats permettent de confirmer qu'une portion prédominante du bassin cellulaire des membres du complexe PIP est localisée dans les FAs des cellules HIEC. Ces mêmes protéines sont également détectées sur les segments les plus internes de certains FAs, ainsi que plus faiblement le long de traits minces et perlés suivant les fibres de stress (Figures 10B, 11B, 11D et 11F). Considérant la présence de l'ILK et de ses partenaires de l'hétérotrimère PIP dans les FBs d'autres modèles cellulaires de

Figure 9 : Caractérisation des structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC

(A-D) Photos d'épifluorescence représentatives de la distribution de (A) la vinculine seule (colorée numériquement en vert) ou (B) codétectée avec l'actine-F (phalloïdine-TRITC; colorée numériquement en rouge), de même que de (C) la paxilline seule (colorée numériquement en vert) ou (D) codétectée avec l'actine-F (phalloïdine-TRITC; colorée numériquement en rouge) chez des cellules HIEC cultivées sur des lamelles de verre préalablement traitées avec du milieu de culture contenant 4 % de sérum FBS. La majorité des cellules HIEC présentent des fibres de stress ventrales parallèles et une organisation de l'axe intégrine-actine représentative du phénotype cellulaire contractile. La vinculine et la paxilline sont principalement détectées au niveau des FAs matures (ex. pointés par les flèches blanches en B et D) situés à l'extrémité des fibres de stress ventrales (ex. pointés par les flèches bleues en B et D), mais également parfois dans les FAs immatures (ex. pointés par les têtes de flèches blanches en B et D) associés aux fibres de stress dorsales (ex. pointé par la tête de flèche bleue en D). (A-D) Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : A : 40  $\mu$ m.

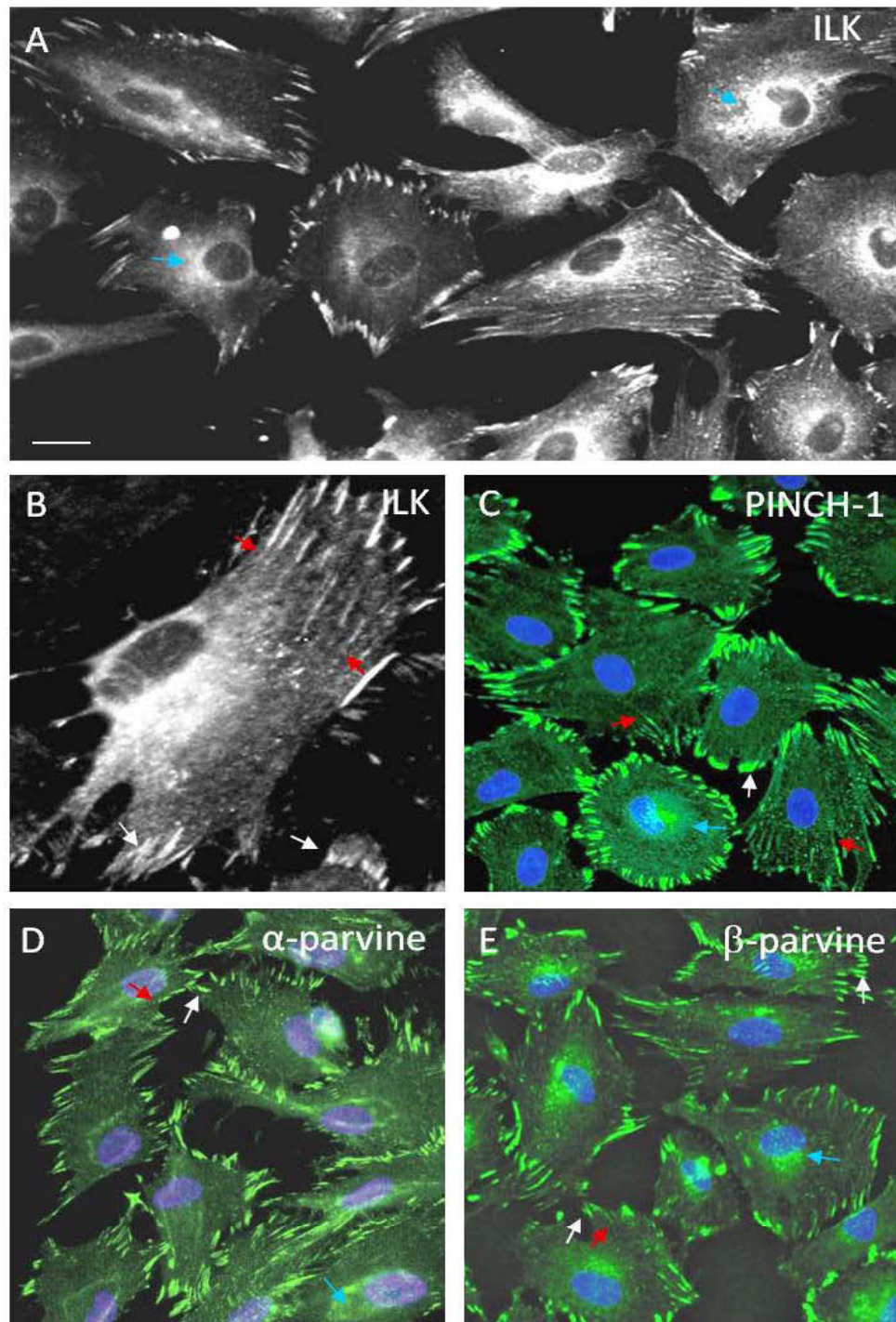


**Figure 9**

Figure 10 : Caractérisation de la distribution des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC

(A-E) Photos d'immunofluorescence représentatives de la distribution de (A et B) l'ILK, (C) PINCH-1, (D) l' $\alpha$ -parvine et (E) la  $\beta$ -parvine chez les cellules HIEC. L'ILK et les autres membres du complexe PIP sont principalement détectés au sein des structures d'adhésion de type FAs (ex. pointés par les flèches blanches en B, C, D et E), de même qu'au sein de motifs linéaires perlés de type FBs visibles sur la portion interne de certains FAs et se poursuivant vers le centre des cellules (ex. pointés par les flèches rouges en B, C, D et E). Finalement, il est possible de détecter que l'ILK et les autres membres du complexe PIP localisent à l'occasion plus fortement dans le cytoplasme et la région périnucléaires (ex. pointés par les flèches bleues en B, C, D et E) des cellules HIEC. (C-E) Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : (A,C-E) en A : 20  $\mu$ m.

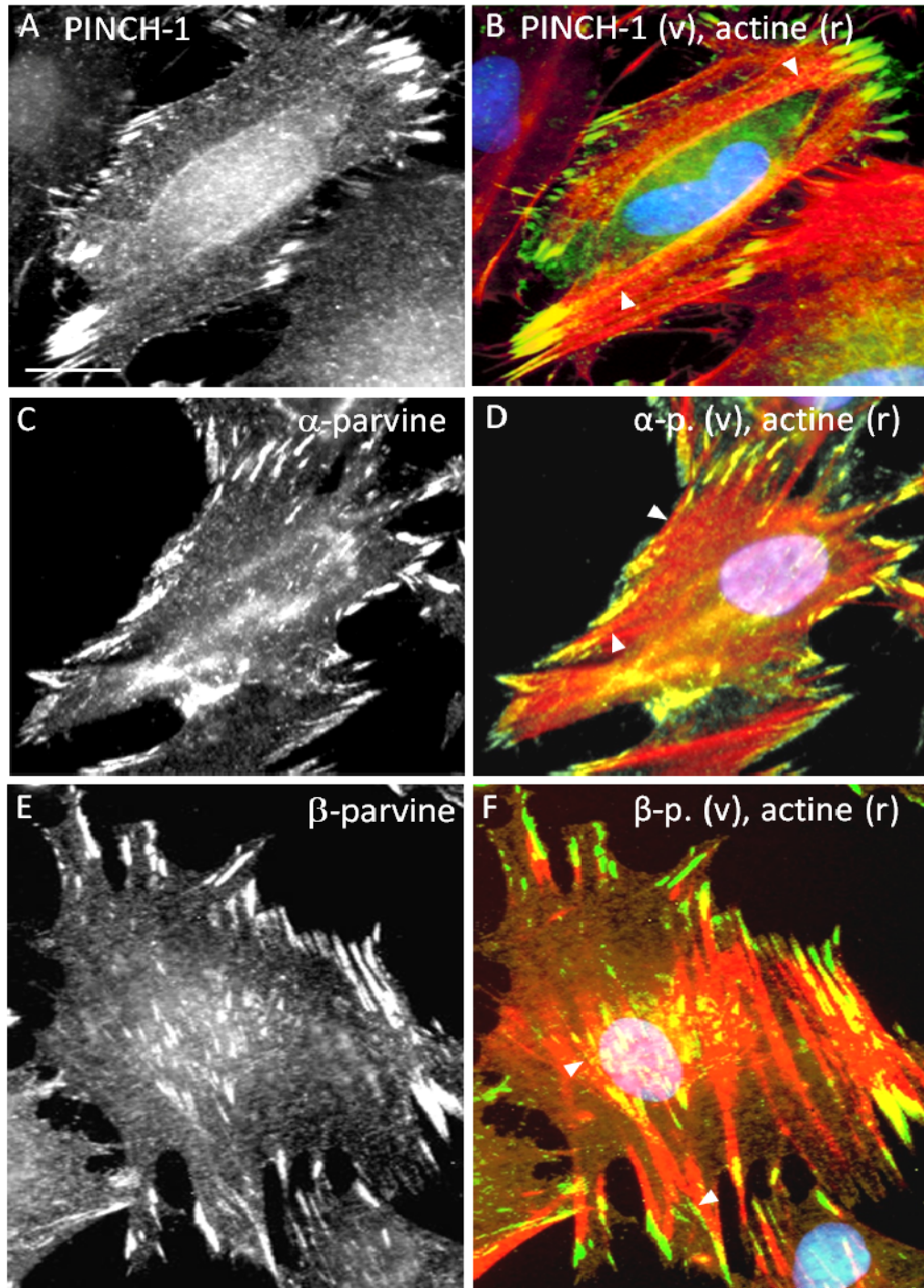




**Figure 10**

Figure 11 : Les membres du complexe PIP sont codistribués avec les structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC

(A-E) Photos d'immunofluorescence représentatives de la distribution de (A et B) PINCH-1, (C et D) l' $\alpha$ -parvine et (E et F) de la  $\beta$ -parvine (A, C et E) seule ou (B, D et F; en vert) codétectés avec le réseau de microfilaments d'actine (phalloïdine-TRITC; en rouge). Les images en B, D et F montrent la détection de ces membres du complexe PIP dans les FAs, de même qu'au sein de motifs linéaires perlés sortant des FAs et/ou longeant les fibres de stress d'actine (ex. pointés par les têtes de flèche en B, D et E). (B, D, F) Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : (A-F) en A : 20  $\mu$ m.



**Figure 11**

mammifères (p. ex. les cellules endothéliales d'aorte bovine BAEC) (Boulter et al., 2006; Stanchi et al., 2009; Vouret-Craviari et al., 2004), cette distribution particulière des membres du complexe PIP suggère fortement que ces protéines participent également à ce type de structure d'adhésion chez les cellules HIEC.

D'autre part, à l'image de la vinculine (Figure 9A) et de la paxilline (Figure 9C), les membres du complexe PIP sont détectés de façon diffuse dans la région centrale du cytoplasme chez certaines cellules HIEC (Figures 10A, 10C, 10D et 10E). Cela suggère qu'une portion de la population des membres du complexe PIP localise dans le cytosol des cellules HIEC et concorde avec le fait que le complexe PIP soit rapporté pour se former dans le cytoplasme cellulaire (Legate et al., 2006). D'autre part, des agrégats ponctués (pleins) et bulbotubulaires (vides) de chacun des membres du complexe PIP sont observés au niveau du cytoplasme et de la région périnucléaire des cellules HIEC (Figures 10A, 10C, 10D et 10E). Ce type de distribution pourrait indiquer que des sous-populations de ces protéines sont associées à des structures du cytoplasme telles que les structures vésiculaires et tubulaires du système endomembranaire (p. ex. le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules endosomales et lysosomales) (Apodaca, 2001; Gu et al., 2001; Meyer et al., 2005; Yuan et al., 2010).

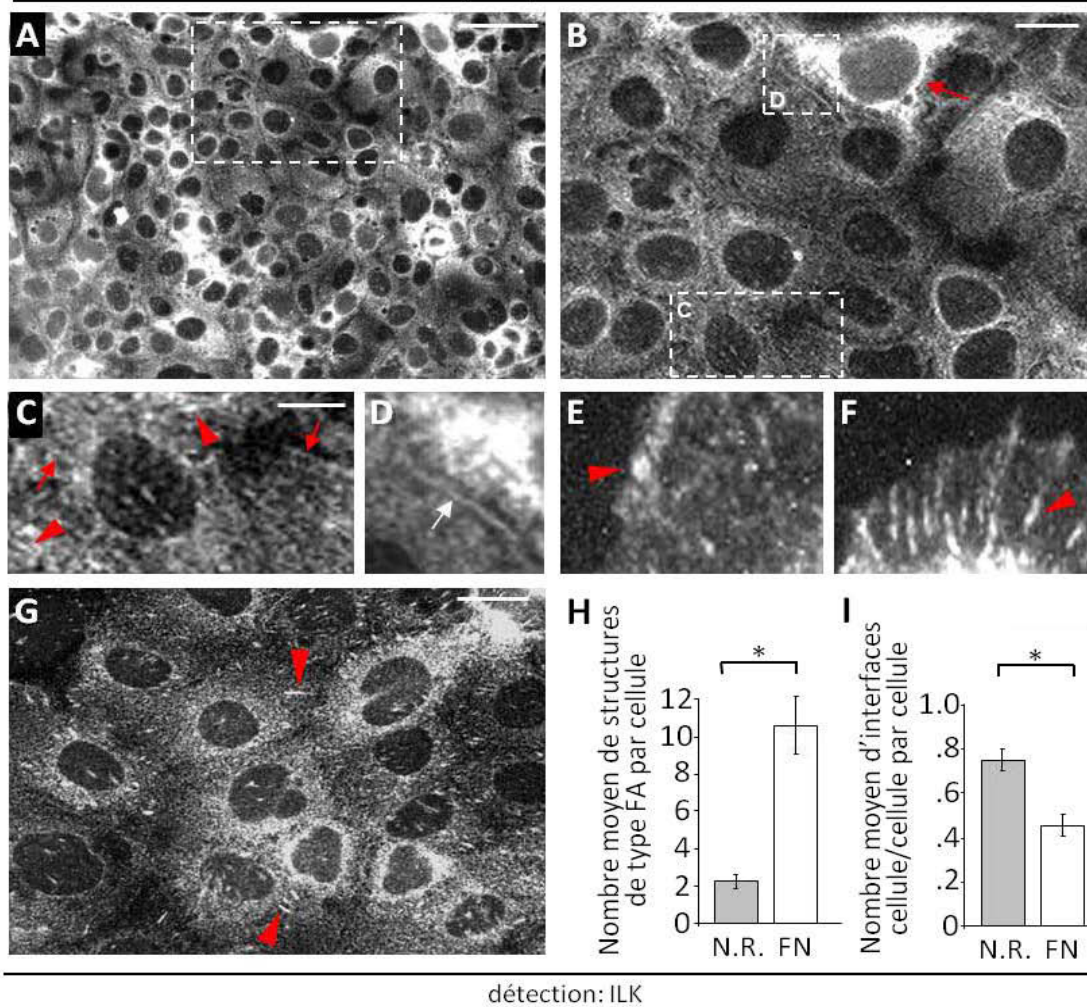
Nous avons également analysé la distribution cellulaire de l'ILK chez les cellules Caco-2/15. D'abord, les immunofluorescences indiquent que l'intensité du marquage de l'ILK varie d'une région à l'autre des colonies de cellules Caco-2/15 sous-confluentes (70%-90% confluentes; Figure 12A). Tout comme chez les cellules HIEC, l'ILK est de plus détectée au niveau du cytoplasme des cellules Caco-2/15 sous-confluentes et produit parfois un marquage plus intense au niveau de la région périnucléaire de ces cellules (Figures 12A et 12B). À plus fort grossissement, il est possible d'observer que le marquage cytoplasmique de l'ILK forme de nombreux motifs linéaires perlés analogues de ceux détectés chez les cellules HIEC (Figures 12B et 12C vs 10B). Certains de ces motifs sont associés à de courtes accumulations allongées de l'ILK en périphérie des cellules Caco-2/15 de la partie interne des colonies (Figure 12C), mais qui sont plus facilement visibles dans les lamellipodes formés par les cellules Caco-2/15 ceinturant ces colonies (Figures 12E et 12F). Ces accumulations se comparent à la distribution de la paxilline, de la taline, de la vinculine et de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines dans les plaques

Figure 12 : Caractérisation de la distribution de l'ILK chez les cellules Caco-2/15

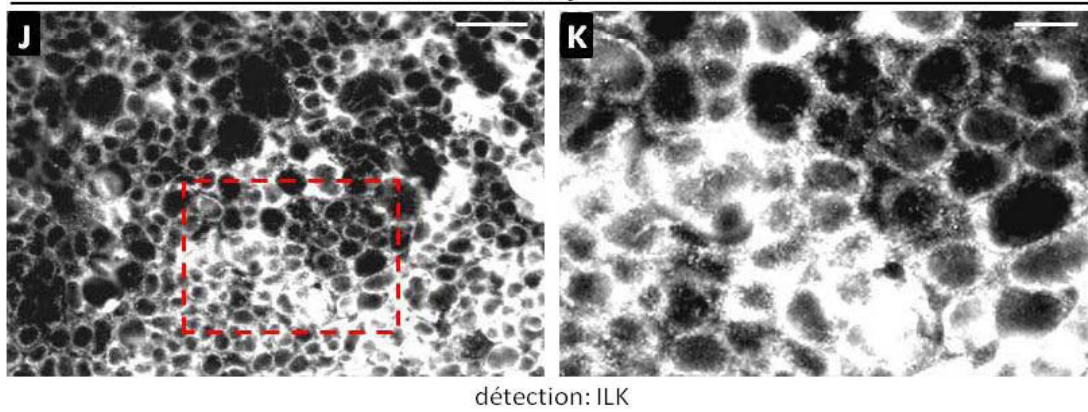
(A) Immunofluorescence représentative de la distribution de l'ILK chez des cellules Caco-2/15 sous-confluentes (70 % à 90 % confluentes) adhérentes sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture. (B) Agrandissement de la zone encadrée en A. Chez certaines cellules l'ILK est exprimée plus fortement dans la région périnucléaire du cytoplasme et en circonférence de l'enveloppe nucléaire (ex. pointé par la flèche rouge). (C et D) Agrandissement de la zone C encadrée en B révélant (C) des motifs linéaires perlés (ex. pointés par les flèches rouges) formés par l'ILK et dont les accumulations aux extrémités produisent des plaques d'adhésion ventrales de type FA chez les cellules Caco-2 (ex. pointés par les têtes de flèche rouges). (D) Agrandissement de la zone D encadrée en B montrant que l'ILK est détectée le long de l'interface membranaire latérale de certaines cellules adjacentes des populations sous-confluentes (flèche blanche). (E et F) Agrandissement des structures d'adhésion de type FA (ex. pointés par les têtes de flèche rouges) présentes au niveau des lamellipodes formés par les cellules ceinturant les colonies des populations cellulaires sous-confluentes. (G) Photo d'immunofluorescence représentative de la distribution de l'ILK chez des cellules Caco-2/15 de populations sous-confluentes adhérentes sur  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine plasmatique exogène humaine (fibronectine exogène; Millipore/Chemicon®). (H et I) Histogrammes du nombre moyen (H) de structures de type FA et (I) d'interfaces cellule/cellule marquées par l'anticorps contre l'ILK chez les cellules Caco-2/15 adhérentes sur une surface non recouverte de fibronectine exogène (N.R) ou une surface recouverte de fibronectine exogène (FN). Chaque analyse statistique correspond à un test t bilatérale avec échantillons paires ( $n = 4$  expériences indépendantes différentes : 750 et 759 cellules ont respectivement été analysées sur une surface N.R. et sur la fibronectine exogène à partir des mêmes photos d'immunofluorescence — deux photos d'immunofluorescence analysées au minimum par expériences;  $* = p < 0.05$ ). (J) Immunofluorescence représentative de la distribution de l'ILK chez des cellules Caco-2/15 de monocouches confluentes depuis trois jours (jour 3 PC) et (K) agrandissement de la zone encadrée en J. Barres d'échelle : A et J : 50  $\mu\text{m}$ ; B et K : 20  $\mu\text{m}$ ; (C-F) en C : 10  $\mu\text{m}$



### Caco-2/15 préconfluentes



### Caco-2/15 jour 3 PC



**Figure 12**

d'adhésion de type FA des cellules Caco-2 (Babbin et al., 2009; Bellissent-Waydelich et al., 1999; Lorentz et al., 1997; Yu et al., 2000). Dans l'ensemble, ces observations tendent à démontrer que la majorité du bassin cellulaire de l'ILK des cellules Caco-2/15 sous-confluentes est codistribuée avec les structures de l'axe intégrine-actine. Finalement, l'ILK est parfois détectée au niveau de l'interface membranaire latérale de certaines cellules Caco-2/15 adjacentes de la partie interne des colonies (Figures 12B et 12D). Cette localisation particulière de l'ILK se rapproche de la distribution des protéines (p. ex. E-cadhérine) associées aux structures d'adhésion cellule-cellule (p. ex. jonctions adhérentes) des cellules Caco-2/15 (Basora et al., 2010; Escaffit et al., 2005a). Considérant que l'ILK a été rapportée pour localiser aux sites d'adhésion intercellulaires chez les cellules épithéliales (Vespa et al., 2005; Vespa et al., 2003), ces observations soulèvent la possibilité qu'une partie de la population cellulaire de l'ILK puisse colocaliser avec ce type de structure d'adhésion chez les cellules Caco-2/15.

Le Pr Vachon et ses collaborateurs ont démontré lors de travaux publiés en 1995 que les cellules Caco-2/15 sous-confluentes expriment la fibronectine, mais déposent peu efficacement cette protéine de la MEC du côté de leur pôle membranaire basal (Vachon et al., 1995). Or, les immunofluorescences de l'ILK chez les cellules Caco-2/15 sous-confluentes présentées dans le paragraphe précédent ont été effectuées avec des cellules cultivées sur une surface « N.R. » (surface non recouverte de fibronectine plasmatique humaine exogène, c.-à-d. dans ce cas des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture). Comparativement à ces dernières (Figure 12B), des cellules Caco-2/15 sous-confluentes cultivées sur des lamelles de verre recouvertes par  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de « fibronectine plasmatique humaine exogène » (Millipore/Chemicon®; sera ultérieurement référée en tant que « fibronectine exogène ») présentent visuellement une accentuation du marquage de l'ILK associé avec les structures de l'axe intégrine-actine. En parallèle, ces cellules semblent également former moins de marquage membranaire latéral de l'ILK (Figure 12G). Ces observations proposent que l'adhésion des cellules Caco-2/15 sous-confluentes sur le substrat de fibronectine exogène stimule le recrutement de l'ILK du côté de leur pôle basal et module la distribution cellulaire de l'ILK. Nous avons donc comparé le nombre de plaques d'adhésion de type FA et d'interfaces cellule/cellule marquées par l'anticorps contre l'ILK lorsque les cellules Caco-2/15 sous-confluentes sont cultivées sur une surface « N.R. » ou sur la fibronectine exogène. Les comptes effectués permettent de confirmer l'augmentation du nombre moyen de plaques d'adhésion de type FA marquées par l'ILK chez les cellules Caco-

2/15 sur la fibronectine exogène comparativement aux mêmes cellules sur une surface N.R. (Figure 12H : FN;  $10.6 \pm 3.1$  vs N.R.;  $2.9 \pm 0.8$  plaques par cellule,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Puis, les comptes révèlent une diminution significative du nombre moyen d'interfaces cellule/cellule marquées par l'ILK chez les cellules Caco-2/15 sur la fibronectine exogène comparativement aux mêmes cellules sur une surface N.R. (Figure 12I : FN;  $0.45 \pm 0.10$  vs N.R.;  $0.74 \pm 0.10$  interfaces par cellule,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Ces résultats démontrent que l'adhésion du pôle membranaire basal des cellules Caco-2/15 sur la fibronectine stimule le recrutement de l'ILK dans les plaques d'adhésion de type FA de ces cellules. De plus, ils indiquent que la fibronectine — et plausiblement ses interactions avec les intégrines membranaires — joue un rôle déterminant dans le contrôle de la distribution cellulaire de l'ILK chez les CEIs.

Pour terminer, nous avons analysé la distribution cellulaire de l'ILK chez des cellules Caco-2/15 confluentes depuis trois jours. Dans ces conditions, le marquage de l'ILK varie d'une région à l'autre de la monocouche (Figure 12J). Considérant d'une part que nous montrons que les niveaux protéiques de l'ILK régressent avec la progression de la différenciation de ces cellules. Et d'autre part, qu'il soit connu que le niveau de polarisation et de différenciation cellulaire est habituellement très hétérogène chez les cellules Caco-2/15 de populations confluentes depuis moins de 20 jours (Vachon and Beaulieu, 1992). Cela suggère que les régions de la monocouche montrant une intensité de marquage plus faible de l'ILK soient associées aux régions où les cellules Caco-2/15 sont à un stade plus avancé de leur processus de différenciation et vice-versa. Le marquage de l'ILK associée aux structures de l'axe intégrine-actine qui prédominait chez les cellules Caco-2/15 sous-confluentes est également beaucoup moins abondant et même virtuellement inexistant chez plusieurs des cellules formant la monocouche confluyente (Figures 12J et 12K). L'ILK est plutôt principalement détectée au niveau de la région périnuclaire et périphérique des cellules (Figure 12K). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les niveaux et la distribution cellulaire de l'ILK sont régulés de façon dynamique chez les cellules Caco-2/15 formant une monocouche confluyente.



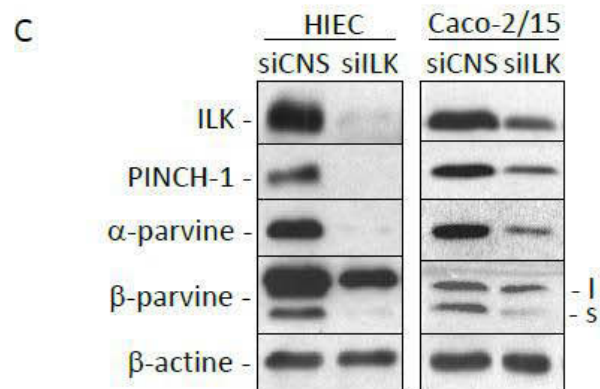
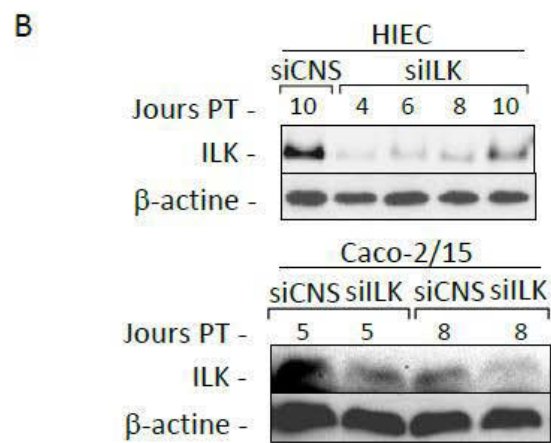
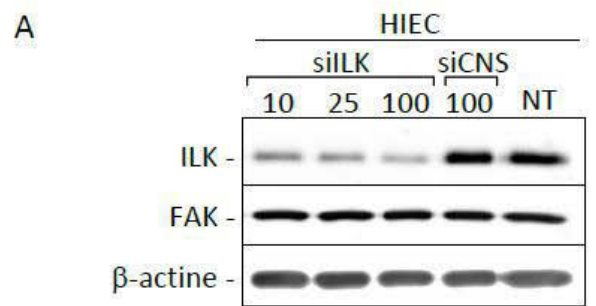
### 3.2 *Analyse des fonctions de l'ILK chez les CEIs en culture*

#### 3.2.1 *Caractérisation des paramètres d'utilisation et des effets d'un ARN interférent ciblant l'ILK chez les cellules HIEC et Caco-2/15*

Les travaux visant à caractériser les fonctions de l'ILK chez les CEIs ont été effectués grâce à la diminution forcée de ses niveaux cellulaires. Pour y arriver, les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 étaient transfectées avec un ARN interférent (siRNA) ciblant spécifiquement l'expression de l'ILK (siILK, Ambion Inc.). Un siRNA ne possédant théoriquement aucune homologie avec les gènes humains (siCNS, Qiagen) a été utilisé comme contrôle expérimental. Pour débiter, nous avons défini les paramètres expérimentaux nous permettant d'obtenir une diminution optimale de l'ILK chez les cellules HIEC. Des analyses préliminaires par immunobuvardage des cellules HIEC transfectées avec 10 nM du siILK ont d'abord révélé que la diminution de l'ILK est effective approximativement 36 heures suivant les transfections (données non présentées). D'autres analyses indiquent que l'inhibition de l'ILK est légèrement plus efficace lors de transfections utilisant 25 nM et 100 nM de siILK (Figure 13A). De plus, la transfection de 100 nM du contrôle siCNS dans les mêmes conditions ne crée aucune variation apparente de l'ILK (Figure 13A). L'inhibition de l'expression de l'ILK par les différentes concentrations du siILK ne cause aucune variation du niveau de la protéine kinase FAK (Figure 13A). Finalement, des analyses en qPCR de l'expression du gène OAS1 chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK confirment l'innocuité du siILK et du siCNS chez ces cellules (données non présentées) en ce qui concerne l'activation non spécifique potentielle de la voie antivirale de réponse à l'interféron par les siRNA (Scherr et al., 2003). À la lumière de ces résultats, une concentration intermédiaire de 40 nM de siRNA a été choisie comme la concentration à utiliser lors des transfections des cellules HIEC et Caco-2/15 avec le siILK (HIEC siILK et Caco-2/15 siILK) et le siCNS (HIEC siCNS et Caco-2/15 siCNS). À cette concentration l'efficacité du siILK devrait être suffisante pour optimiser l'inhibition de l'expression de l'ILK observée à 25 nM tout en limitant la possibilité d'induire les effets non spécifiques (p. ex. stimulation ou répression de l'expression d'autres gènes) qui sont parfois associés à l'utilisation des siRNA à une concentration de 100 nM et plus (Persengiev et al., 2004).

Figure 13 : Caractérisation des paramètres de l'inhibition artificielle de l'expression de l'ILK par un ARN interférent spécifique chez les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15

(A) Immunobuvardages représentatifs des niveaux protéiques de l'ILK chez des cellules HIEC transfectées avec 10, 25 et 100 nM d'un ARN interférent (siRNA) dirigées contre l'ILK (siILK) ou avec 100 nM d'un siRNA contrôle (siCNS). Des cellules HIEC natives non transfectées (NT) ont été utilisées comme contrôle du niveau endogène de l'ILK chez cette lignée cellulaire. La détection de la protéine kinase FAK a été utilisée comme contrôle de la spécificité du siILK dans l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC. (B) Immunobuvardages de cellules HIEC et Caco-2/15 transfectées avec 40 nM de siILK ou siCNS et qui ont été récoltées à différents jours suivants les transfections (post transfection (PT)). (C) Immunobuvardages représentatifs des niveaux protéiques de l'ILK, PINCH-1, l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez des cellules HIEC et Caco-2/15 transfectées avec 40 nM de siILK ou siCNS et qui ont été récoltées 72 heures PT. (A-C) Les niveaux de la  $\beta$ -actine ont été utilisés comme contrôle de normalisation protéique.



**Figure 13**

Nous avons également évalué la durée de l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC et Caco-2/15. D'abord, des pétris de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ont été récoltés à différents temps, et ce, jusqu'au 10<sup>e</sup> jour post-transfection (PT). Les analyses en immunobuvardage montrent que l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC siILK demeure efficace jusqu'au 8<sup>e</sup> jour PT (Figure 13B). Les cellules Caco-2/15 étaient pour leur part transfectées à sous-confluences et récoltées confluentes au 5<sup>e</sup> jour PT et au 8<sup>e</sup> jour PT. Dans ce cas, les analyses en immunobuvardage démontrent que la diminution artificielle de l'ILK chez les cellules Caco-2/15 siILK est toujours effective au 8<sup>e</sup> jour PT. De plus, les niveaux de l'ILK chez les cellules Caco-2/15 siILK continuent à décroître entre le 5<sup>e</sup> jour PT et le 8<sup>e</sup> jour PT plausiblement en raison de la baisse endogène de l'ILK chez les cellules des populations confluentes. Dans tous les cas, ces données confirment que l'inhibition de l'expression de l'ILK par le siILK demeure efficace au minimum jusqu'au 8<sup>e</sup> jour post-transfection chez les cellules HIEC siILK, ainsi que chez les cellules Caco-2/15 siILK formant une monocouche.

Considérant qu'il a été démontré que la formation du complexe PIP stabilise les niveaux cellulaires de chacun de ses membres en empêchant leur dégradation par les voies du protéasome (Fukuda et al., 2003), nous avons évalué par immunobuvardage l'effet de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur les niveaux protéiques des autres membres du complexe. Dans ce cas, nous observons une diminution des niveaux de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine, de la  $\beta$ -parvine comparable à celle de l'ILK, et ce, autant chez les cellules HIEC siILK que chez les cellules Caco-2/15 siILK (Figure 13C). Il est à noter que ces résultats s'accordent avec ceux de Wang et coll. (2009) concernant l'inhibition de l'expression de l'ILK par un siRNA sur le niveau de l' $\alpha$ -parvine chez les cellules Caco-2 indifférenciées (Wang and Basson, 2009). Par ailleurs, alors que le niveau de  $\beta$ -parvine-s et de  $\beta$ -parvine-l diminue fortement chez les cellules HIEC siILK, seul le niveau de  $\beta$ -parvine-s diminue de façon effective chez les cellules Caco-2/15 siILK (Figure 13C). Cette observation supporte nos données précédentes suggérant que ces deux isoformes de la  $\beta$ -parvine soient régulées de façon distincte chez les cellules Caco-2/15.

Puisque les résultats en immunobuvardage démontrent que l'inhibition de l'expression de l'ILK par le siILK est efficace, mais incomplète, nous avons procédé à des immunofluorescences afin de mieux caractériser les effets du siILK sur les niveaux et la distribution de l'ILK et de ses partenaires de l'hétérotrimère PIP chez les cellules HIEC siILK. D'abord, la détection de chacun des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC siCNS produit des marquages en tout

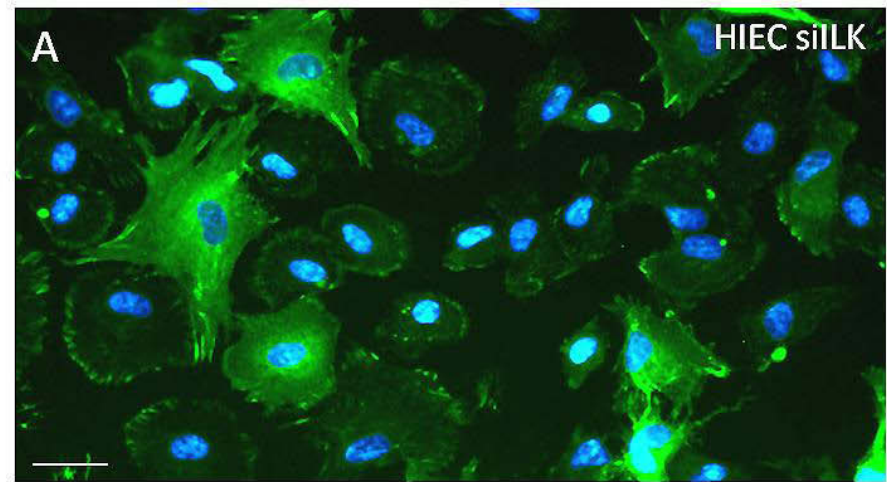
point conformes de ceux présentés lors de la détection de ces mêmes protéines chez les cellules HIEC natives (images des cellules HIEC siCNS non présentées, voir la figure 10). Pour ce qui est des cellules HIEC siILK, les images des immunofluorescences révèlent que la diminution de l'ILK est inégale d'une cellule à l'autre et que l'ILK continue souvent d'être détectée faiblement au niveau des structures d'adhésion périphérique de type FA (Figure 14A). Néanmoins, une série de comptes indiquent qu'approximativement 83 % des cellules HIEC siILK présentent une diminution efficace de l'ILK. Les immunofluorescences des autres membres du complexe PIP chez ces mêmes cellules indiquent que les effets de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur l' $\alpha$ -parvine (Figure 14B), la  $\beta$ -parvine (Figure 14C) et PINCH-1 (Figure 14D) sont globalement comparables de ceux sur l'ILK (Figure 14A). Toutefois, contrairement à cette dernière, les membres des parvines (Figures 14B et 14C) et PINCH-1 (Figure 14D) demeurent faiblement détectés au niveau de la région centrale du cytoplasme des cellules HIEC siILK. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'expression de l'ILK est cruciale dans le maintien et l'intégrité de la distribution des autres membres du complexe tripartite PIP chez les cellules HIEC.

D'autre part, nous observons que certains ilots de cellules Caco-2/15 siILK préconfluentes expriment toujours des niveaux substantiels de l'ILK (Figure 14F). Néanmoins, comparativement aux cellules Caco-2/15 siCNS (Figure 14E), l'inhibition de l'expression de l'ILK est habituellement visuellement effective chez environ la moitié des cellules Caco-2/15 siILK (Figure 14F). Ainsi, la baisse endogène naturelle de l'ILK chez les cellules HIEC siILK confluentes exprimant toujours l'ILK explique pourquoi tel que nous l'avons montré à la figure 13B, le niveau de l'ILK des cellules Caco-2/15 siILK continue à décroître entre le 5<sup>e</sup> jour PT et le 8<sup>e</sup> jour PT.

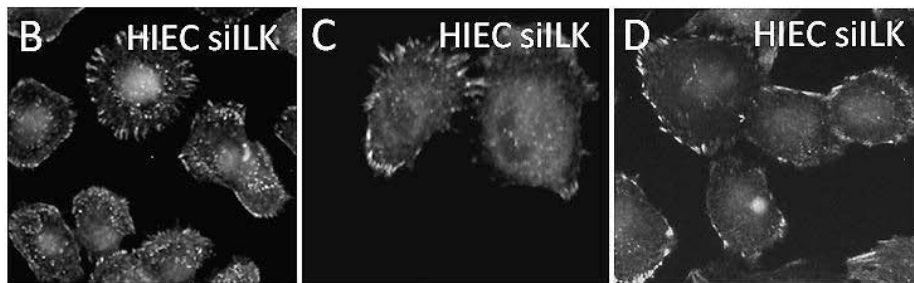
Pour terminer, des informations utiles concernant les effets des interactions entre l'ILK et ses partenaires PINCH et parvines proviennent de nos tentatives mitigées visant à surexprimer l'ILK de type sauvage, ainsi que son variant muté chez des cellules HIEC. En effet, nous avons détecté des niveaux comparables de l'ILK endogène et de l'ILK exogène chez des populations de cellules HIEC V5-ILKwt sélectionnées à partir de populations cellulaires infectées par des rétrovirus codant une construction de l'ILK de type sauvage (V5-ILKwt) (Figure 14G). Dans ce cas, il semble que l'expression de l'ILK exogène cause une diminution d'un ordre comparable du niveau cellulaire de l'ILK endogène (Figure 14G). Contrairement à ce que nous observons chez

Figure 14 : Détection des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC siILK et Caco-2/15 siILK

(A-E) Photos d'immunofluorescence représentatives de la distribution des bassins protéiques résiduels de (A) l'ILK (en vert), (B) PINCH-1, (C) l' $\alpha$ -parvine et (D) la  $\beta$ -parvine chez les cellules HIEC siILK. (E et F) Photos d'immunofluorescence représentatives de l'expression de l'ILK (en vert) chez (E) les cellules Caco-2/15 siCNS et (F) Caco-2/15 siILK préconfluentes. (G) Immunobuvardages des niveaux cellulaires de la forme endogène de l'ILK (détectée avec l'anticorps contre l'ILK (BD Transduction Laboratories)), ainsi que des formes exogènes de type sauvage (V5-ILKwt) ou de type mutée (V5-ILKkd [E359K]) de l'ILK (détectées avec l'anticorps contre l'ILK ou un anticorps spécifique ciblant le marqueur moléculaire V5 (Invitrogen)) qui sont exprimées de façon stable chez les cellules HIEC V5-ILKwt et les cellules HIEC V5-ILKkd respectivement. Des cellules transfectées avec un vecteur d'expression vide ont été utilisées comme contrôle de transfection, de même que du niveau endogène de l'ILK chez les cellules HIEC. (A, E et F) Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (bleu). Barres d'échelle : (A-D) en A : 50  $\mu$ m; (E et F) en E : 25  $\mu$ m



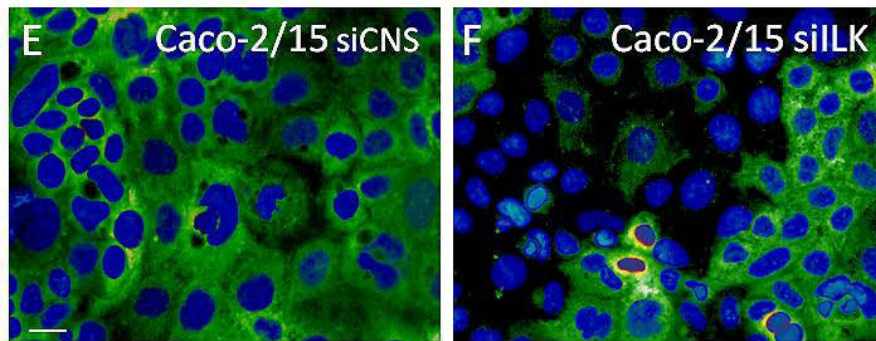
ILK (vert)



PINCH-1

$\alpha$ -parvine

$\beta$ -parvine



ILK (vert)



Figure 14

les cellules HIEC V5-ILKwt, nous ne détectons pas de variation apparente du niveau de l'ILK endogène chez les cellules HIEC V5-ILKkd infectées par des rétrovirus codant pour la forme mutée de l'ILK (V5-ILKkd [E359K]). De plus, chez ces dernières cellules les quantités de la construction V5-ILKkd demeurent faibles comparativement au niveau de l'ILK endogène, de même que comparativement au niveau de la construction V5-ILKwt détecté chez les cellules HIEC V5-ILKwt (Figure 14G). Or, la mutation précise E359K sur le domaine kinase de la construction V5-ILKkd empêche son association avec les membres des parvines, de même qu'avec la paxilline. Cela entrave du même coup la capacité de cette forme mutée de l'ILK de participer au complexe PIP et d'intégrer les FAs (Nikolopoulos and Turner, 2002; Wickstrom et al., 2010b; Zhang et al., 2002). Ces informations suggèrent donc que chez les cellules HIEC V5-ILKkd, les faibles niveaux de V5-ILKkd s'expliquent par l'incapacité de ce variant mutée de l'ILK à former le complexe PIP. La diminution de l'ILK endogène et notre incapacité à surexprimer fortement la construction de l'ILK de type sauvage chez les cellules HIEC V5-ILKwt tendent à démontrer que les quantités endogènes limitées des parvines et de PINCH-1 s'opposent à la stabilisation de quantités supplémentaires de l'ILK chez les cellules HIEC. Soulignons que des résultats équivalents ont été obtenus suite à l'expression exogène de l'ILK type sauvage et type muté chez des cellules HIEC transfectées de façon transitoire avec des vecteurs d'expression codant pour ces mêmes constructions (données non présentées), de même que chez des cellules HIEC où l'expression de ces constructions étaient contrôlée par un système régulé d'induction de l'expression de type tet-on/tet-off (données non présentées).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les siRNA et lors des tentatives de surexpressions des constructions de l'ILK démontrent que chez les CEIs la formation du complexe PIP est essentielle afin de stabiliser les niveaux cellulaires de l'ILK, PINCH-1 et des parvines.



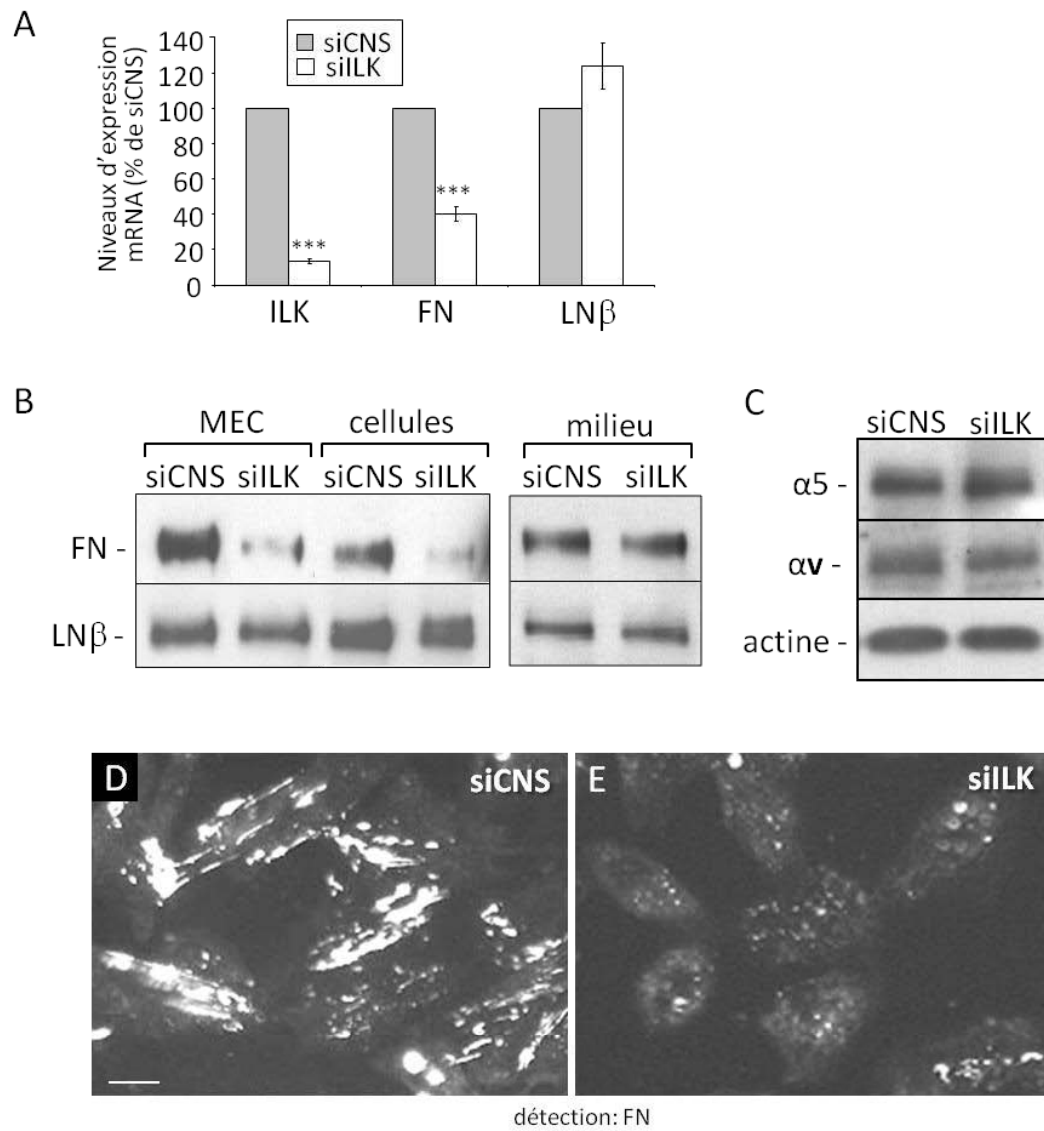
### 3.2.2 *L'expression de l'ILK contribue à induire l'expression de la fibronectine et le processus de dépôt/assemblage de cette dernière chez les cellules HIEC*

Une étude par Wu et coll. (1998) rapporte que l'expression de l'ILK chez le modèle de CEI de rat IEC-18 stimule le processus de dépôt/assemblage de la fibronectine par l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Wu et al., 1998). Dans la même optique, nous avons précédemment dénoté une corrélation entre le patron de distribution de l'ILK à la base des cellules de l'axe crypte-villosité intestinale et celui de la fibronectine dans la MEC de la *lamina propria* et la lame basale sous-épithéliale (voir les figures 6B et 7G). Considérant ces informations, nous avons analysé l'impact de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur l'expression et la déposition de la fibronectine des cellules HIEC.

Pour débiter, nous avons comparé les niveaux d'expression de la fibronectine par qPCR chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Les résultats montrent que la forte diminution du transcrit d'ARNm de l'ILK chez les cellules HIEC siILK (Figure 15A, ILK :  $10.6 \pm 3.5$  % de la valeur de siCNS,  $p < 0.001$ ,  $n \geq 3$ ) est accompagnée d'une baisse appréciable de l'expression de la fibronectine (Figure 15A, FN :  $39.0 \pm 10.3$  % de la valeur de siCNS,  $p < 0.001$ ,  $n \geq 3$ ). L'expression de la chaîne  $\beta 1$  des laminines qui a été utilisée comme gène contrôle demeure pour sa part statistiquement inchangée comparativement aux cellules HIEC siCNS (Figure 15A, LN $\beta$ ). Ensuite, des analyses en immunobuvardage sur des fractions cellulaires (cellules sans la MEC) et matricielles (MEC sans les cellules) isolées des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 48 heures sur le plastique des pétris, confirment que comparativement aux cellules contrôles, beaucoup moins de fibronectine est détectée chez les cellules HIEC siILK (Figure 15B; cellules, siILK vs siCNS) et dans la MEC de ces cellules (Figure 15B; MEC, siILK vs siCNS). Cependant, les quantités de fibronectines humaines détectées dans le milieu des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK sont comparables (Figure 15B; milieu, siILK vs siCNS; siILK :  $106.3 \pm 15.5$  % de la valeur obtenue avec le siCNS,  $n \geq 3$ ). Puisqu'une portion importante de la fibronectine exprimée par les cellules en culture est directement sécrétée dans le milieu de culture avant de s'associer aux cellules et d'être assemblée en matrice péricellulaire (Hayman and Ruoslahti, 1979), ces derniers résultats suggèrent fortement que la fibronectine sécrétée par les cellules HIEC siILK s'accumule dans leur milieu. Par conséquent, cela supporte qu'en plus de ses effets sur l'expression de la fibronectine, l'inhibition de l'expression de l'ILK entrave la capacité des cellules HIEC siILK à assembler cette protéine en matrice extracellulaire.

Figure 15 : L'inhibition de l'expression de l'ILK affecte l'expression et la déposition de la fibronectine chez les cellules HIEC

(A) Histogramme montrant les niveaux d'ARNm de l'ILK et de la fibronectine détectés par qPCR (PCR quantitative) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Les niveaux d'ARNm de l'ILK sont diminués efficacement par le siILK et l'expression de la fibronectine diminue significativement chez les cellules traitées avec le siILK. Le niveau d'ARNm de la chaîne  $\beta 1$  des laminines (LN $\beta$ ) a été utilisé comme contrôle de l'expression génétique des autres protéines de la MEC. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (siCNS)  $\pm$  l'erreur standard. Pour chaque gène l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Ce type de test t est valide et utilisé pour déterminer si un échantillon est différent de la moyenne hypothétique de l'échantillon contrôle lorsque la variance réelle de ce dernier est inconnue. (B) Immunobuvardages représentatifs de la fibronectine (endogène) humaine détectée par l'anticorps HFN 7.1 (DSHB) chez les fractions cellulaires (cellules : cellules sans la MEC) et matricielles (MEC : MEC sans les cellules, isolées avec 27  $\mu$ M d'hydroxyde d'ammonium) de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 48 heures au préalable, ainsi que de la fibronectine (endogène) soluble humaine détectée par le même anticorps dans le milieu de culture (milieu) de ces cellules. L'expression des chaînes  $\beta 1\gamma 1$  de la laminine (LN $\beta$ ) a été utilisée comme contrôle de normalisation protéique. (C) Immunobuvardages représentatifs des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha v$  des intégrines effectués sur des extraits protéiques totaux de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. L'expression de la  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation protéique. (D et E) Immunofluorescences représentatives de la fibronectine détectée par l'anticorps HFN 7.1 chez les cellules HIEC siCNS et siILK non perméabilisées. Barre d'échelle : (E et F) en E : 25  $\mu$ m.



**Figure 15**

L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  est typiquement reconnue pour être la principale intégrine responsable de l'assemblage de la fibronectine et l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  peut également contribuer à ce processus dans certaines conditions (Barczyk et al., 2010; Singh et al., 2010). Ainsi, afin de déterminer si la diminution de la fibronectine dans la MEC des cellules HIEC siILK est causée par une diminution de l'expression et/ou des quantités protéiques de ces deux récepteurs intégrines de la fibronectine, nous avons analysé les niveaux de la sous-unité  $\alpha 5$  et de la sous-unité  $\alpha v$  chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Cependant, les immunobuvardages ne révèlent aucune différence notable du niveau protéique de ces deux sous-unités des intégrines entre les deux populations cellulaires expérimentales (Figure 15C;  $\alpha 5$  et  $\alpha v$ , siCNS vs siILK).

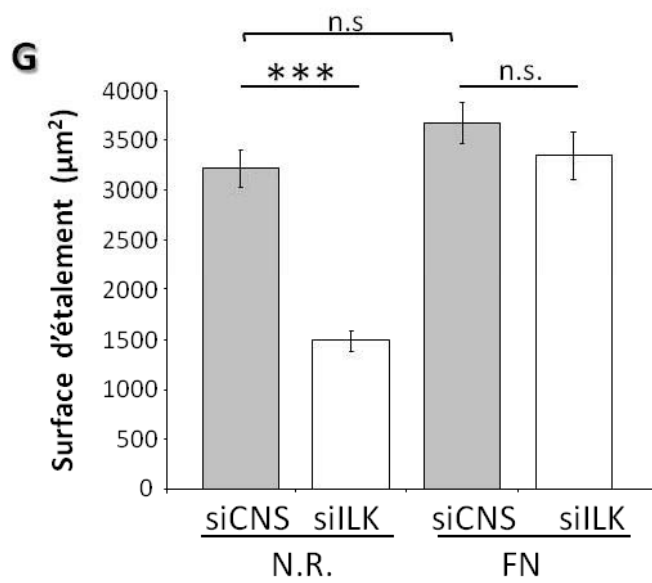
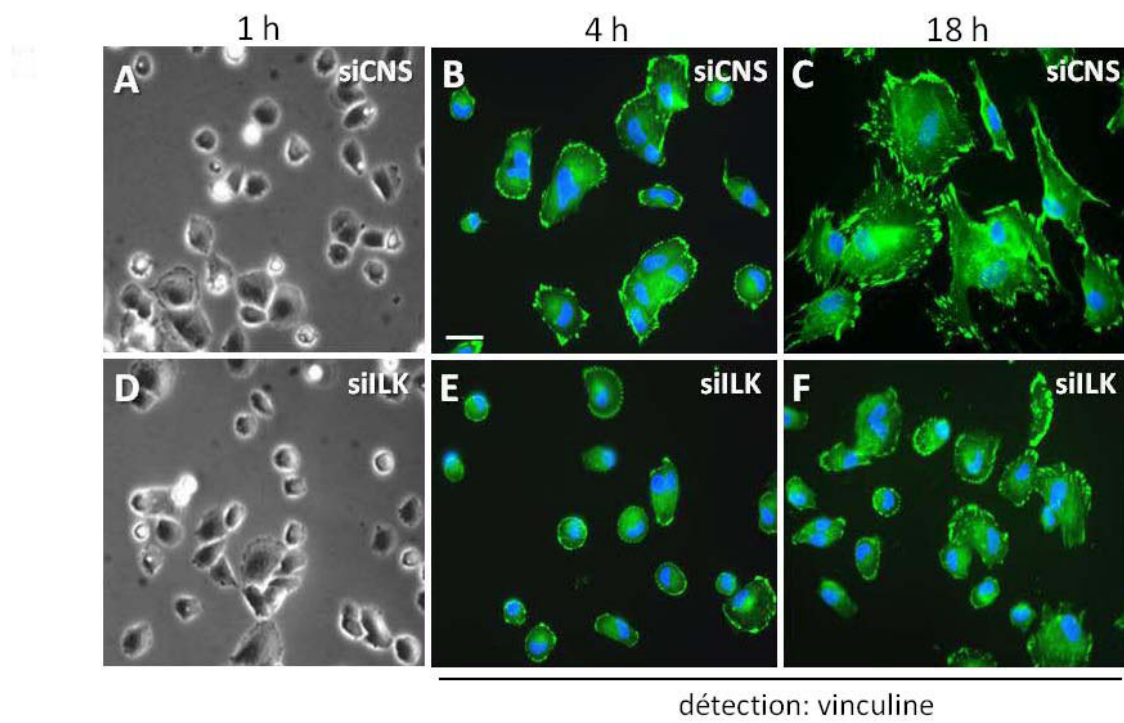
Afin de mieux documenter la diminution de la fibronectine dans la MEC des cellules HIEC siILK nous avons examiné l'organisation de la fibronectine qui est associée aux cellules HIEC siCNS et HIEC siILK avec l'anticorps HFN 7.1 (DSHB) en immunofluorescence. Cet anticorps cible spécifiquement un épitope cryptique entre les sites PHSRN/synergie (du domaine FNIII<sub>9</sub>) et RGD (du domaine FNIII<sub>10</sub>) de la fibronectine et pour cette raison est considéré comme une sonde efficace pour détecter les homodimères étirés et partiellement étirés de la fibronectine associée aux cellules (Baneyx et al., 2002; Garcia et al., 1999; Keselowsky et al., 2003). Les images montrent que comparativement aux cellules HIEC siCNS (Figure 15D), beaucoup moins de fibronectine est associée aux cellules HIEC siILK (Figure 15E). De plus, alors que les cellules HIEC siCNS présentent plusieurs structures linéaires et allongées typiques des réseaux de fibronectine fibrillaire (Ohashi et al., 2002) (Figure 15D), la fibronectine associée aux cellules HIEC siILK est principalement détectée sous la forme d'agrégats dont les caractéristiques suggèrent qu'il s'agit de fibronectine préfibrillaire (Figure 15E) (Baneyx et al., 2001; Ohashi and Erickson, 2011). Ces résultats supportent dans l'ensemble que l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC bloque le processus déposition/assemblage de la fibronectine endogène soluble en matrice péricellulaire de fibronectine fibrillaire.

### *3.2.3 La contribution principale de l'ILK pour les fonctions des CEIs en culture est indirecte et médiée par son rôle crucial dans la déposition de la fibronectine endogène*

Il est bien connu que l'expression de l'ILK contribue à réguler les fonctions de l'axe MEC-intégrine-actine chez différents types cellulaires (Wickstrom et al., 2010b). Nous avons donc débuté notre exploration du rôle de l'ILK dans les fonctions des CEIs en étudiant la dynamique du processus d'adhésion/étalement et de formation des structures d'adhésion de type FA chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Plus spécifiquement, pour ces expériences l'étalement cellulaire et les structures d'adhésion cellule-MEC des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ont été visualisés en immunofluorescence en marquant la vinculine 4 heures et 18 heures après que ces cellules eurent été ensemencées sur des lamelles de verre préalablement traitées avec du milieu de culture (4 % de sérum FBS). En premier lieu, les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ont été observées en microscopie par contraste de phase une heure après le début des tests d'étalement. À ce stade, la majorité des cellules des deux populations possèdent toujours une morphologie très arrondie ce qui indique qu'elles sont toujours dans la phase isotropique du processus d'étalement cellulaire (Figures 16A et 16D) (Dubin-Thaler et al., 2008). Puis, 4 heures après l'ensemencement des cellules, la vinculine détectée chez les cellules HIEC siCNS et chez les cellules HIEC siILK est principalement détecté au niveau des structures d'adhésion périphériques peu développées (Figures 16B et 16E) dont les caractéristiques visuelles correspondent à celles des FXs et des FAs immatures (Gardel et al., 2010). Toutefois, comparativement aux cellules HIEC siCNS, les structures d'adhésion détectées à ce stade chez les cellules HIEC siILK sont généralement moins développées et l'étalement arrondi plus symétrique de type isotropique de ces cellules dénote un retard dans leur processus d'étalement (Figure 16E vs 16B). Le marquage de la vinculine 18 heures après l'ensemencement des cellules indique que les cellules HIEC siCNS forment plusieurs FAs imposants de type tardif et présentent un étalement asymétrique mature de type anisotropique (Figure 16B) qui est comparable à celui des cellules HIEC natives cultivées de routine à sous-confluences (voir la figure 9A). Le marquage de la vinculine chez les cellules HIEC siILK à ce stade se rapproche de celui observé chez les cellules HIEC siCNS à 4 heures (Figure 16F vs 16B). Ces résultats indiquent que l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC est nécessaire pour l'intégrité de la dynamique de l'étalement et pour l'élaboration des FAs mature.

Figure 16 : L'ILK contribue au processus d'adhésion/étalement des cellules HIEC de façon indirecte par son rôle dans la déposition de la fibronectine endogène

(A et D) Images de microscopie par contraste de phase des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK une heure après leur ensemencement sur des lamelles prétraitées avec du milieu de culture (4% FBS). (B, C, E et F) Photos d'immunofluorescence représentatives de la distribution de la vinculine (en vert) et de l'étalement des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK 4 heures et 18 heures après leur ensemencement sur des lamelles de verre prétraitées. (G) Histogramme de l'aire d'étalement moyen (évaluée à partir d'images de microscopie avec le logiciel Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corp.)) des cellules HIEC siCNS et de cellules HIEC siILK ensemencées depuis 24 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (N.R.) ou sur des lamelles recouvertes par  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). Les résultats sont exprimés en aire d'étalement absolue ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  l'erreur standard. Chaque analyse statistique correspond à un test t bilatéral avec échantillons pairés ( $n = 3$  expériences indépendantes différentes, 60 cellules au minimum ont été analysées au total pour chacune des conditions; \*\*\* =  $p < 0.0001$ , n.s. =  $p$  non significatif). (B,C, E et F) Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : (A-F) en C :  $40 \mu\text{m}$ .



**Figure 16**

Nous avons également analysé les effets de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur l'aire d'étalement des cellules HIEC en mesurant numériquement l'aire d'étalement des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées depuis plus de 24 heures à partir d'images de microscopie. Ces analyses indiquent que lorsque ces cellules sont cultivées directement sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (surface N.R.), il y a une diminution marquée de l'aire d'étalement moyenne couverte par les cellules HIEC siILK comparativement aux cellules contrôles (Figure 16E; HIEC siILK :  $1487 \mu\text{m}^2 \pm 104$  vs HIEC siCNS :  $3216 \mu\text{m}^2 \pm 190$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n \geq 3$ ). Ces données indiquent que le processus d'étalement des cellules HIEC siILK s'arrête prématurément. Considérant que la fibronectine est un constituant central de l'interface cellule/MEC contribuant à la régulation des processus impliquant l'axe MEC-intégrine-actine tel que l'adhésion/étalement (Singh et al., 2010), nous avons de plus mesuré l'aire d'étalement des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées durant plus de 24 heures sur des lamelles de verre recouvertes de  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). Nos résultats indiquent que dans cette condition d'adhésion les cellules HIEC siILK ont une aire d'étalement moyen comparable à celle des cellules contrôles (Figure 16E; HIEC siILK :  $3346 \mu\text{m}^2 \pm 241$  vs HIEC siCNS :  $3671 \mu\text{m}^2 \pm 200$ , différences non significatives (n.s.),  $n \geq 3$ ). D'autre part, l'aire d'étalement des cellules HIEC siCNS sur la fibronectine demeure comparable de celle que ces cellules présentent sur une surface N.R. (Figure 16E : FN siCNS vs N.R. siCNS, n.s.,  $n \geq 3$ ). Ces résultats indiquent que l'étalement arrondi de type isotropique des cellules HIEC siILK est incomplet et que l'adhésion sur la fibronectine permet l'étalement complet des cellules HIEC. Dans l'ensemble, les données présentées dans la figure 17 suggèrent que l'expression de l'ILK contribue à la transition vers la phase anisotropique du processus d'étalement des cellules HIEC par les effets de cette expression permettant à ces cellules de déposer la fibronectine.

Le processus de migration dirigée demande une régulation fine de l'élaboration et du démantèlement des structures d'adhésion cellule-MEC (Lock et al., 2008). Pour cette raison, nous avons vérifié si l'impact négatif de l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC siILK se transpose également en une réduction de la vitesse de migration chez ces cellules. Nous avons donc comparé la capacité des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK à migrer à partir de la marge de blessures générées 48 heures au préalable à l'aide d'une lame de rasoir sur des populations cellulaires fraîchement confluentes. Pour ces expériences, le milieu de culture des cellules était supplémenté de 2 mM d'hydroxyurée afin d'empêcher les biais pouvant résulter



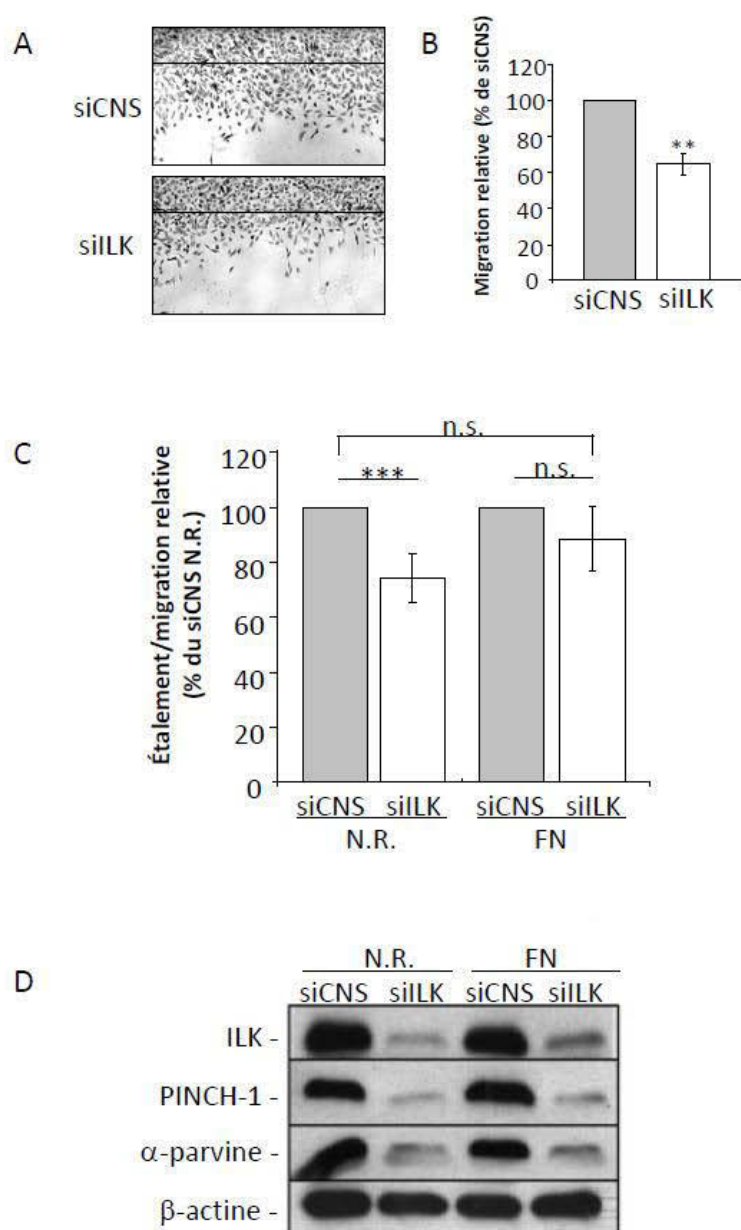
d'un taux de prolifération différent des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK (Cai et al., 2000). Les résultats montrent que comparativement aux cellules contrôles, beaucoup moins de cellules HIEC siILK franchissent en moyenne la marge des blessures (Figures 17A et 17B). Cela indique donc qu'à l'image des données concernant l'adhésion/étalement, la capacité migratoire des cellules HIEC (siILK) est également réduite par l'inhibition de l'expression de l'ILK.

Ensuite, nous avons effectué des essais d'étalement/migration d'agrégats de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK afin de comparer le rôle de l'ILK et de la fibronectine sur la dynamique du processus d'étalement/migration des cellules HIEC. Lors de ces essais, l'aire occupée par des agrégats de 50 à 100 cellules était mesurée 24 heures après leur ensemencement sur une surface N.R. (plastique des pétris non recouvert de FN exogène) ou sur un substrat de fibronectine exogène, puis divisée par le nombre respectif de cellules formant ces agrégats. Nos analyses révèlent sans surprise que sur une surface N.R., les cellules HIEC siILK ont une vitesse d'étalement/migration significativement plus lente que celle des cellules HIEC siCNS (Figure 17C). De plus, les cellules HIEC siILK ensemencées sur une surface de fibronectine exogène présentent une vitesse d'étalement/migration comparable de celle des cellules HIEC siCNS (Figure 17C). Par conséquent, ces résultats confirment que les altérations de l'étalement et le ralentissement de la migration qui sont associés avec une réduction de la déposition de la fibronectine chez les cellules HIEC siILK peuvent être secourus lorsque ces cellules sont ensemencées sur un substrat de fibronectine exogène. D'autre part, des immunobuvardages effectués sur des lysats de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK indiquent que l'adhésion sur la fibronectine exogène ne permet pas de restaurer les niveaux protéiques des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC siILK (Figure 17D). Cela exclut donc que les effets du substrat de fibronectine exogène sur le rétablissement des capacités d'étalement et de migration des cellules HIEC siILK soient médiés par la restauration du niveau de ces protéines dans ces conditions.

Le processus de restitution permet de cloisonner les blessures produites par les nombreux stress (p. ex. stress mécanique) exercés sur le feuillet épithélial de la muqueuse intestinale (Mammen and Matthews, 2003). En condition normale, la restitution épithéliale s'effectue sans prolifération cellulaire immédiate, mais requiert la dépolarisation des cellules épithéliales

Figure 17 : L'ILK contribue aux processus de migration des cellules HIEC de façon indirecte par son rôle dans la déposition de la fibronectine endogène

(A) Photos de microscopie par contraste de phase représentatives de la migration des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK à l'intérieur de blessures produites sur des populations de ces cellules fraîchement confluentes. (B) Histogramme du nombre de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ayant traversé le front de migration des blessures 48 heures après leur formation. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (siCNS)  $\pm$  l'erreur standard. Pour ces expériences, le milieu des cellules était préalablement supplémenté de 2 mM d'hydroxyurée afin d'empêcher la prolifération cellulaire. L'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ;  $p < 0.01$ ). (C) Histogramme de la capacité d'étalement/migration des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Pour ces essais, l'aire occupée par des agrégats de 50 à 100 cellules était mesurée 24 heures après l'ensemencement des agrégats sur une surface N.R. ou sur un substrat de  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). Le milieu des cellules était supplémenté de 2 mM d'hydroxyurée pour la durée des essais. L'aire couverte par les agrégats (évaluée à partir des images de microscopie par contraste de phase des agrégats avec le logiciel Metamorph Imaging System) était ensuite divisée par le nombre de cellules étalées (comptées à partir d'images de microscopie) ayant migrées à partir des agrégats. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (siCNS N.R.)  $\pm$  l'erreur standard. Chaque analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s. =  $p$  non significatif). (D) Immunobuvardages représentatifs de l'ILK, PINCH-1 et de l' $\alpha$ -parvine effectués sur des lysats de cellules HIEC siCNS et de cellules HIEC siILK 72 h après leur ensemencement sur une surface N.R. ou sur  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). L'expression de la  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation protéique.



**Figure 17**

polarisées, de même que l'étalement et la migration coordonnée de ces dernières afin de recouvrir l'espace produit par les blessures. Or, en raison de leur capacité à former une monocouche de cellules polarisées, les cellules Caco-2/15 sont couramment utilisées pour l'étude de ce processus dans l'intestin (Basson et al., 1996). Nous avons donc analysé les effets de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur la capacité de restitution en 48 h des monocouches de cellules Caco-2/15 siILK (confluentes depuis 24 heures et blessés par aspiration; Figure 18A, 0 h). Ces expériences se déroulaient en présence de 2 mM d'hydroxyurée afin d'empêcher la prolifération des cellules. Les résultats indiquent qu'en moyenne les blessures se referment statistiquement plus lentement chez les cellules Caco-2/15 siILK comparativement aux cellules Caco-2/15 siCNS servant de contrôle (Figure 18A : 0 h vs 24 h et Figure 18B : sans FN, siILK :  $62.7 \pm 3.0$  % vs siCNS :  $74.5 \pm 3.4$  % de restitution de l'aire originale des blessures). Comme l'adhésion sur la fibronectine a été démontrée pour stimuler la restitution des épithéliums (Margadant and Sonnenberg, 2010), nous avons effectué les mêmes essais en présence de fibronectine exogène ajoutée dans le milieu de culture immédiatement après que les monocouches aient été blessés. La présence de fibronectine exogène permet de secourir la capacité de restitution des cellules Caco-2/15 siILK comparativement aux cellules Caco-2/15 siCNS servant de contrôle (Figure 18B : siILK vs siCNS). Ces résultats indiquent que l'expression de l'ILK et la fibronectine contribue à l'intégrité du processus de restitution des cellules Caco-2/15. De plus, ils suggèrent que l'ILK contribue à l'intégrité de ce processus par des effets fibronectine-dépendants.

### *3.2.4 L'ILK stimule la prolifération des CEIs en culture essentiellement par le biais de son rôle crucial dans la déposition de la fibronectine endogène*

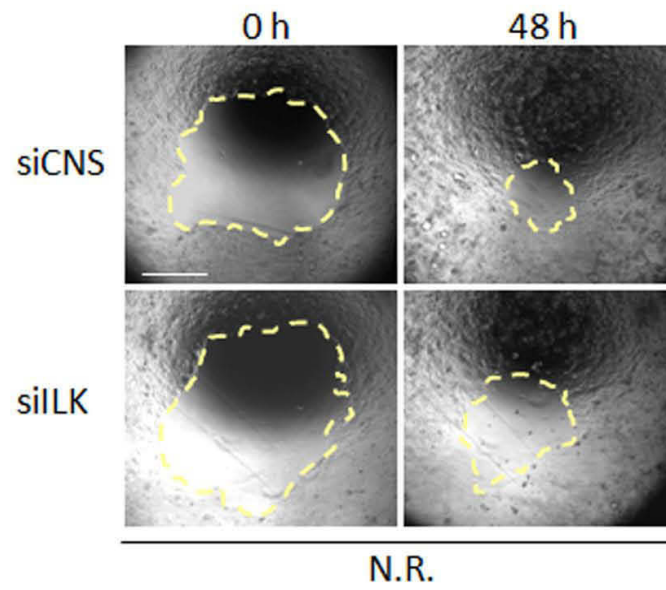
Le respect de l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'axe crypte-villosité nécessite une régulation rigoureuse de la migration et de la prolifération des CEIs (Pageot et al., 2000; Potten et al., 1997). Or, l'expression de l'ILK a été démontrée pour stimuler la prolifération de différents types cellulaires (p. ex. CEIs, chondrocytes, kératinocytes) (McDonald et al., 2008; Wickstrom et al., 2010b). Nous avons donc analysé les effets de l'inhibition forcée de l'expression de l'ILK sur la croissance des CEIs en culture. D'abord, des analyses en immunobuvardage de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire révèlent que

Figure 18 : L'inhibition forcée de l'expression de l'ILK ralentit le processus de restitution épithéliale des monocouches de cellules Caco-2/15

(A) Photos de microscopie par contraste de phase représentatives des monocouches de cellules Caco-2/15 siCNS et Caco-2/15 siILK immédiatement après qu'elles eu été blessées par aspiration (0 h) et 48 heures après la formation des blessures (48 h). Les pointillés sur les images indiquent l'aire couverte par les blessures à 0 h et 48 h. Le milieu de culture des cellules était supplémenté de 2 mM d'hydroxyurée afin d'empêcher la prolifération cellulaire.

(B) Histogramme représentant la vitesse de restitution relative des cellules Caco-2/15 siCNS et Caco-2/15 siILK cultivées en absence de fibronectine exogène (sans FN) ou en présence de fibronectine exogène (FN) ajoutée dans le milieu de culture à une concentration équivalente à  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de la surface des pétris. La fibronectine était ajoutée immédiatement après la formation des blessures. Les résultats sont exprimés en pourcentage absolu de la restitution des blessures initiales  $\pm$  l'erreur standard. Chaque analyse statistique correspond à un test t avec échantillons pairés ( $n = 3$  expériences indépendantes différentes pour chaque condition;  $* = p < 0.05$ , n.s. = p non significatif). Barre d'échelle : (A) en siCNS à 0 h : 300  $\mu\text{m}$ .

A



B

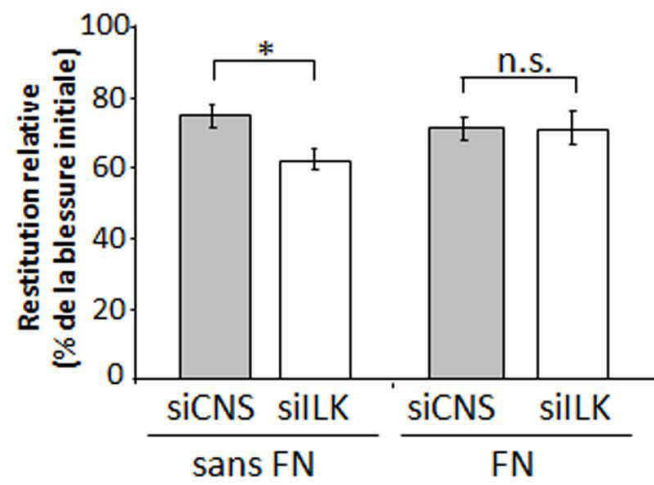


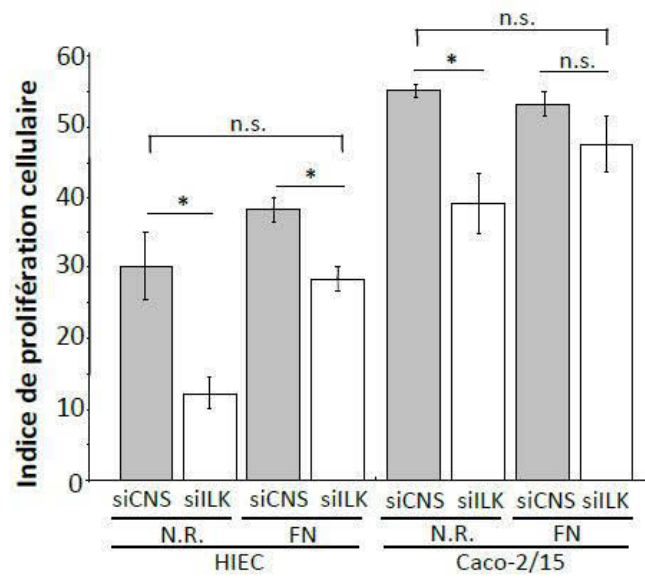
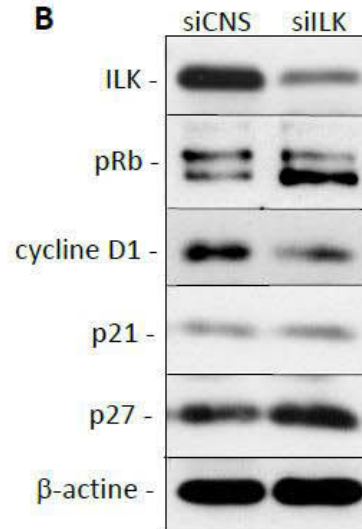
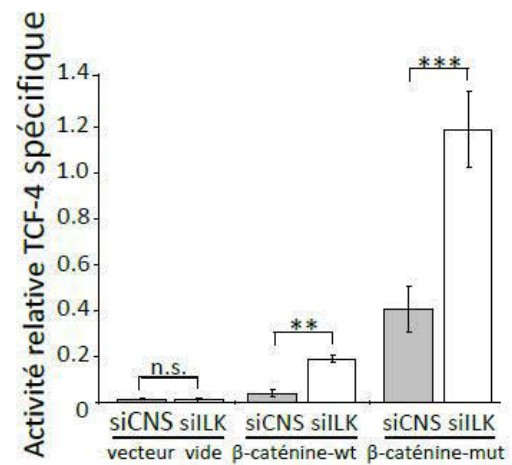
Figure 18

comparativement aux cellules HIEC siCNS, les cellules HIEC siILK (cultivées sur une surface N.R.) présentent une diminution substantielle des niveaux de la cycline D1 (Figure 19B). Les cellules HIEC siILK présentent de plus une augmentation de la forme inactive hyperphosphorylée de la protéine de suppression tumorale pRB (Figure 19B), de même que de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p27 (Figure 19B). Ainsi, bien que le niveau de la protéine inhibitrice des cyclines p21 demeure inchangé en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK (Figure 19B), ces résultats supportent que l'expression de l'ILK contribue à stimuler la progression du cycle cellulaire chez les CEIs indifférenciées en culture. Ensuite, nous avons effectué des essais d'incorporation de BrdU de 4 heures chez des cellules HIEC et Caco-2/15 transfectées avec les siRNA et cultivées sur une surface N.R. ou sur la fibronectine exogène. Nos résultats démontrent que comparativement à leur contrôle respectif, l'inhibition de l'expression de l'ILK induit une diminution de l'indice de prolifération cellulaire (ou indice prolifératif : pourcentage de cellules marquées par le BrdU) chez les cellules HIEC siILK (Figure 19A; N.R.-HIEC : siILK vs siCNS) et Caco-2/15 siILK (Figure 19A, N.R.-Caco-2/15 : siILK vs siCNS) cultivées sur une surface N.R. L'adhésion des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène permet toutefois de restaurer leur indice prolifératif au niveau de celui des cellules HIEC siCNS sur une surface N.R. (Figure 19A, FN/HIEC siILK vs N.R./HIEC siCNS). Cet indice demeure cependant légèrement plus bas que celui des cellules HIEC siCNS sur la fibronectine (Figure 19A, FN/HIEC : siCNS vs siILK). Ensuite, l'adhésion des cellules Caco-2/15 siILK sur la fibronectine exogène permet de rétablir l'indice prolifératif de ces cellules au niveau de celui des cellules Caco-2/15 siCNS dans les deux conditions d'adhésion (Figure 19A, FN/Caco-2/15 siILK vs N.R./ et FN/Caco-2/15 siCNS). Or, contrairement à l'indice prolifératif des cellules HIEC siCNS cultivées sur la fibronectine exogène qui augmente (Figure 19A, FN/HIEC siCNS vs N.R./HIEC siCNS), celui des cellules Caco-2/15 siCNS demeure statistiquement inchangé indépendamment du substrat d'adhésion (Figure 19A, FN/Caco-2/15 siCNS vs N.R./Caco-2/15 siCNS). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le rôle de l'ILK dans le processus de déposition de la fibronectine stimule la prolifération des CEIs indifférenciées. De plus, le rétablissement seulement partiel de l'indice prolifératif des cellules HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène suggère que l'expression de l'ILK pourrait contribuer à la stimulation du cycle cellulaire des CEIs normales par une ou des fonctions différentes de celle concernant uniquement les effets prolifératifs de la fibronectine.

Figure 19 : Les fonctions de l'ILK dans la prolifération des CEIs indifférenciées dépendent principalement des effets de la fibronectine

(A) Histogrammes des indices de prolifération cellulaire obtenus par des essais d'incorporation du BrdU de 4 heures chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK et des cellules Caco-2/15 siCNS et Caco-2/15 siILK adhérentes sur une surface non recouverte (N.R.) ou recouverte de  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). L'indice de prolifération cellulaire (ou indice prolifératif) représente le pourcentage de cellules marquées par le BrdU. Chaque analyse statistique correspond à un test t avec échantillons pairés ( $n \geq 3$ ; \* =  $p < 0.05$ , n.s. = p non significatif). (B) Immunobuvardages représentatifs de la cycline D1, de pRB et des protéines p21 et p27 chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. L'expression de la  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation protéique. (C) Histogramme de l'activité relative du promoteur TCF-4 chez des cellules HIEC siCNS et siILK exprimant stablement soit la  $\beta$ -caténine type sauvage ( $\beta$ caténine-wt), soit une forme mutée de la  $\beta$ -caténine résistante à la dégradation (S37A;  $\beta$ caténine-mut) ou soit un vecteur vide servant de contrôle (vecteur vide). L'activité relative TCF-4 a été calculée à partir des résultats d'essais luciférase utilisant le système plasmidique TOPflash/FOPflash comme rapporteur de l'activité du promoteur TCF-4, ainsi que le plasmide renilla pRL-Luc comme contrôle interne de l'efficacité de transfection. Les signaux luminescents Firefly et Renilla ont été mesurés 48 heures après les cotransfections des siRNA et des gènes rapporteurs. Les valeurs de l'activité relative du promoteur TCF-4 ont été calculées pour chacune des conditions en soustrayant le ratio FOPflash-firefly/renilla du ratio TOPflash-firefly/renilla. Chaque analyse statistique correspond à un test t avec échantillons pairés (vecteur vide :  $n \geq 3$ ; n.s. = p non significatif,  $\beta$ caténine-wt :  $n \geq 3$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ,  $\beta$ caténine-mut :  $n \geq 3$ ; \*\*\* =  $p < 0.0001$ ).



**A****B****C**

**Figure 19**

Par ailleurs, l'ILK et le complexe PIP ont été identifiés pour contribuer aux voies de signalisation canonique et non canonique de Wnt qui sont impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF (Oloumi et al., 2010; Oloumi et al., 2006; Persad et al., 2001). La littérature rapporte de plus que ces fonctions de l'ILK stimulent la prolifération chez les CEIs (Bravou et al., 2006; Huang et al., 2007; Marotta et al., 2003; Tan et al., 2001). Considérant ces informations, nous avons analysé si les fonctions de l'ILK impliquées dans la stimulation de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine. Des essais luciférase utilisant le système plasmidique TOPflash/FOPflash comme rapporteur de la stimulation de l'activité du promoteur TCF-4 par la  $\beta$ -caténine (Coghlan et al., 2000) et les plasmides renilla pRL-Luc comme contrôle interne de l'efficacité de transfection, ont été effectués chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Toutefois, la voie Wnt est normalement peu active chez les cellules HIEC qui expriment peu de  $\beta$ -caténine endogène (Escaffit et al., 2005b; Guezguez et al., 2014). Les siRNA ont donc été transfectés chez des cellules HIEC exprimant stablement des constructions exogènes codant pour soit la  $\beta$ -caténine type sauvage ( $\beta$ caténine-wt), soit une forme mutée de la  $\beta$ -caténine qui inhibe sa dégradation (S37A;  $\beta$ caténine-mut) (Morin et al., 1997; Young et al., 1998) ou soit un vecteur vide servant de contrôle (vecteur vide). Les signaux luminescents Firefly et Renilla étaient mesurés 48 heures après les transfections des siRNA. Les résultats de ces essais confirment d'abord que l'activité relative  $\beta$ -caténine/TCF-4 spécifique est virtuellement indétectable chez les cellules HIEC contrôles transfectées avec le siCNS ou avec le siILK (Figure 19C; plasmide vide). L'expression exogène de la  $\beta$ -caténine de type sauvage (Figure 19C;  $\beta$ caténine-wt) et de la forme mutée de la  $\beta$ -caténine (Figure 19C;  $\beta$ caténine-mut) stimule l'activité relative TCF-4 spécifique chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK (Figure 19C;  $\beta$ caténine-mut vs vecteur vide). Remarquablement, dans les deux cas cette activité est stimulée de façon plus marquée chez les cellules HIEC siILK comparativement aux cellules HIEC siCNS. Ces dernières données suggèrent donc que l'ILK agit comme répresseur potentiel de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF chez les cellules HIEC. Ces résultats tendent donc à exclure que l'ILK puisse favoriser la prolifération des CEIs normales et indifférenciées en culture en contribuant directement à l'activation de la voie Wnt.

Soulignons en terminant que deux essais TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling : permet de détecter les fragments issus de la dégradation de l'ADN internucléosomique lors du processus de mort cellulaire programmé) indépendants n'ont

pas permis de détecter de différence révélatrice du pourcentage de cellules apoptotiques chez les populations de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées normalement sur une surface N.R. (données non présentées, HIEC siCNS 2.0 % vs HIEC siILK 2.3 %, n = 2). Ces expériences préliminaires suggèrent par le fait même que les fonctions de l'ILK ne sont pas essentielles pour la survie des CEIs indifférenciées.

### *3.2.5 Les effets de l'inhibition exogène de l'expression de l'ILK n'altèrent pas l'expression des marqueurs de différenciation chez les cellules Caco-2/15*

Nous avons également évalué les effets de la diminution artificielle de l'ILK sur la capacité des cellules Caco-2/15 à se différencier. Dans ce cas, les niveaux d'expression de la villine et des enzymes dipeptidyle peptidase IV et sucrase-isomaltase — trois marqueurs de la différenciation entérocytaires (Tremblay et al., 2006; Vachon and Beaulieu, 1992) — ont été analysés par qPCR chez les cellules Caco-2/15 siCNS et siILK. Ces dernières étaientensemencées à haute densité (afin de limiter les biais potentiels d'un décalage du moment où ces cellules atteignent la confluence) et cultivées confluentes pendant 6 jours. Toutefois, ces analyses n'ont pas révélé de différences significatives des niveaux d'ARNm des marqueurs de différenciation en condition d'inhibition de l'ILK (Figure 20). De plus, des immunobuvardages effectués sur des cellules cultivées dans des conditions comparables n'ont pas montré de changement de l'expression protéique de la sucrase-isomaltase chez les cellules Caco-2/15 siILK (données non présentées). Ces résultats suggèrent donc que dans ces conditions le processus de différenciation des cellules Caco-2/15 n'est pas altéré par l'inhibition hâtive de l'expression de l'ILK par le siILK.

Figure 20 : L'inhibition exogène de l'expression de l'ILK n'altère pas l'expression des marqueurs de différenciation chez les cellules Caco-2/15

Histogramme des niveaux d'ARNm des marqueurs de différenciation entérocytaire dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), sucrase-isomaltase (S.I.) et villine qui sont détectés par qPCR chez des cellules Caco-2/15 siCNS et Caco-2/15 siILK confluentes depuis 6 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (siCNS)  $\pm$  l'erreur standard. Pour chaque gène l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; n.s. = non significatif).

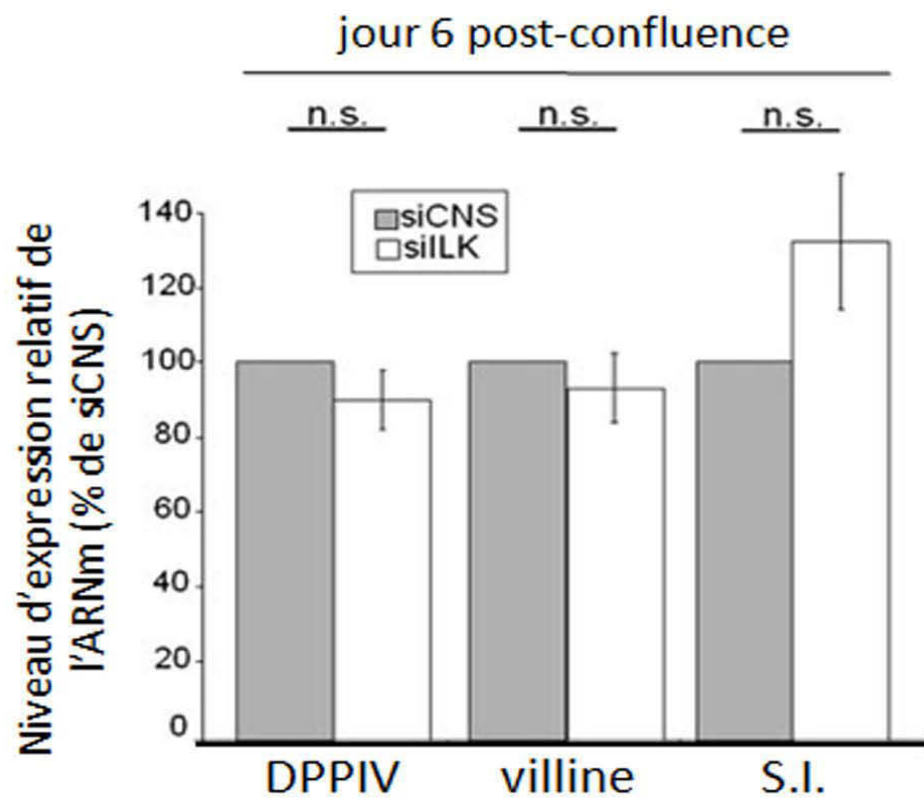


Figure 20

### 3.3 *Caractérisation des fonctions de l'ILK dans la dynamique structurale et fonctionnelle de l'axe MEC-intégrine-actine des CEIs indifférenciées*

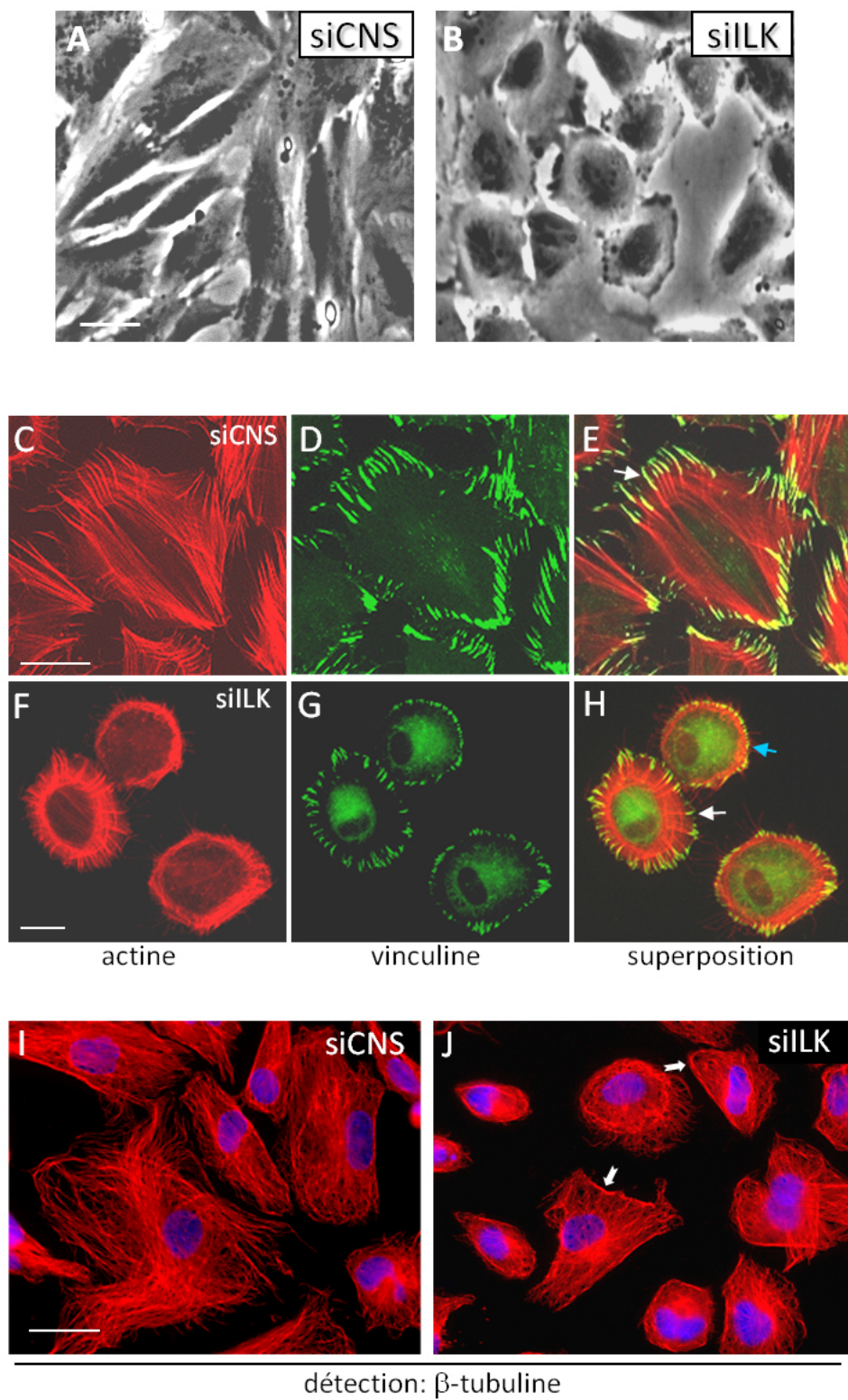
Jusqu'à maintenant, nos résultats indiquent que chez les CEIs une portion prépondérante du bassin cellulaire de l'ILK est stabilisée par le complexe PIP au sein des sites d'adhésion cellule-MEC de type FA. De plus, nous avons établi que les altérations aux processus d'étalement, de migration et de prolifération dénotées en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK chez les modèles de CEI HIEC et Caco-2/15 proviennent selon toutes vraisemblances des effets de l'entrave à la déposition de la fibronectine endogène sur ces mêmes fonctions. Considérant que l'expression de l'ILK est principalement observée chez les CEIs indifférenciées *in vivo* et *ex vivo*, les travaux subséquents chez les cellules HIEC avaient pour but de mieux documenter les fonctions de l'ILK et du complexe PIP dans la dynamique structurale et fonctionnelle de l'axe MEC-intégrine-actine des CEIs indifférenciées.

#### 3.3.1 *L'expression de l'ILK permet le développement du phénotype cellulaire contractile chez les cellules HIEC*

Pour débiter, nous avons comparé en microscopie par contraste de phase l'effet de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur la morphologie des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK préconfluentes. D'abord, la géométrie planaire polarisée présentée par la plupart des cellules HIEC siCNS (Figure 21A) correspond avec le phénotype cellulaire contractile de type fibroblastique des cellules HIEC natives sous-confluentes cultivées de routine (Perreault and Beaulieu, 1996; Prager-Khoutorsky et al., 2011). Cette morphologie contraste considérablement avec la géométrie arrondie et l'aire d'étalement réduit des cellules HIEC siILK (Figure 21B) qui adoptent plutôt une morphologie de type épithélioïde (Rodriguez-Boulán and Nelson, 1989; Xiong et al., 2010). Ces dernières observations concordent avec nos résultats précédents obtenus lors des tests d'étalements chez ces cellules. Comme des modifications aussi marquées de la morphologie des cellules HIEC siILK indiquent des changements de l'organisation du cytosquelette cellulaire, nous avons comparé la distribution des sites d'adhésion des intégrines (détecté par la vinculine) et l'organisation du cytosquelette d'actine (visualisé avec la

Figure 21 : L'inhibition de l'expression de l'ILK bloque l'élaboration du phénotype contractile chez les cellules HIEC

(A et B) Photos représentatives de microscopie par contraste de phase de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK sous-confluentes sur une surface N.R. Dans ces conditions les cellules HIEC siCNS présentent une morphologie étirée de type fibroblastique, alors que les cellules HIEC siILK présentent plutôt une morphologie arrondie de type épithélioïde. (C-H) Photos d'épifluorescence représentatives de la détection du réseau de microfilaments d'actine (actine : détectée avec la phalloïdine-TRITC et colorée numériquement en rouge) et de la vinculine (vinculine, colorée numériquement en vert) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK et de la combinaison de ces deux marquages (superposition). La flèche en E pointe un FA mature de type tardif qui est associé avec une fibre de stress ventrale chez les cellules HIEC siCNS. La flèche blanche et la flèche bleue en H pointent respectivement un FA immature de type précoce associé avec une fibre de stress dorsale et un FX en présence d'actine corticale chez les cellules HIEC siILK. (I et J) Photos d'immunofluorescence représentatives du réseau de microtubules (détecté par un anticorps contre la  $\beta$ -tubuline (Millipore/Chemicon®) et colorée numériquement en rouge) chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Les flèches en J pointent des accumulations périphériques du réseau de microtubule chez les cellules HIEC siILK. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barres d'échelle : (A et B) en A : 30  $\mu$ m; (C-E) en C : 30  $\mu$ m; (F-H) en F : 30  $\mu$ m; (A et B) en A : 30  $\mu$ m.



**Figure 21**



phalloïdine-TRITC) en immunofluorescence chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. D'abord, sans surprise les cellules HIEC siCNS présentent habituellement un réseau élaboré de fibres de stress ventrales parallèles et de FAs matures (Figures 21C à 21E) qui se compare en tout point avec l'organisation des structures de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC natives (voir la figure 9B). Pour leur part, les cellules HIEC siILK présentent soit une ceinture (partielle ou entière) d'actine corticale formée par des accumulations circulaires et/ou angulaires de faisceaux d'actine en périphérie des cellules (Figure 21F, cellule du haut) (Burridge and Wittchen, 2013). Soit une organisation orthogonale de l'actine constituée principalement de fibres de stress dorsales et d'arcs transverses (Figure 21F, cellule du centre/milieu) ou encore une organisation mixte à la fois corticale et orthogonale de l'actine (Figure 21F, cellule du bas). Conformément à l'absence de réseau élaboré de fibres de stress ventrales en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK, la vinculine est principalement détectée au niveau des FXs et des FAs immatures en périphérie des cellules HIEC siILK (Figures 21G et 21H). Une portion du bassin cellulaire de la vinculine est de plus détectée de façon diffuse au niveau de la région cytoplasmique de ces cellules (Figures 21G et 21H). Dans l'ensemble, ces résultats et nos données précédentes concernant les effets de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur le processus d'adhésion/étalement des cellules HIEC (voir la figure 16) démontrent que l'organisation corticale et/ou orthogonale du réseau d'actine-F et la morphologie épithélioïde des cellules HIEC siILK représentent un stade intermédiaire immature du processus d'étalement des cellules HIEC. Plus précisément, cette organisation de type précontractile de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC siILK indique que l'inhibition de l'expression de l'ILK empêche la transition de la phase isotropique vers la phase anisotropique du processus d'étalement qui est associée avec le développement des structures matures de l'axe intégrine-actine (p. ex. fibres de stress ventrales parallèles et FAs de type tardif) et en parallèle, du phénotype cellulaire contractile de type fibroblastique (Prager-Khoutorsky et al., 2011).

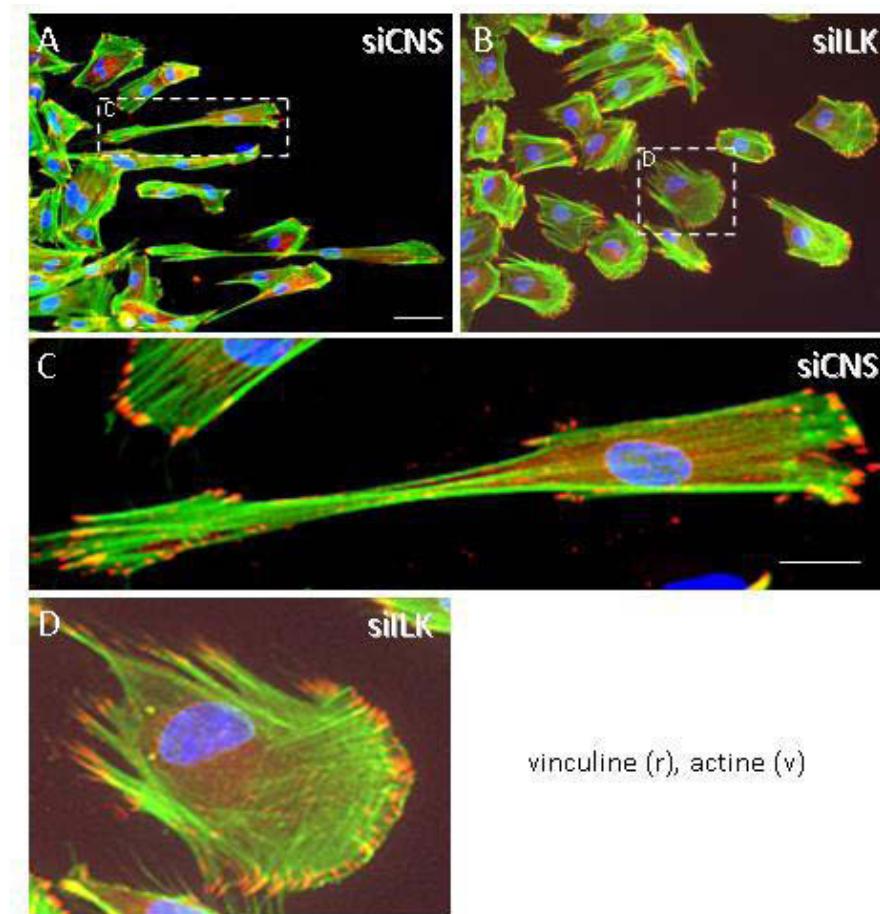
L'ILK a été identifiée chez les kératinocytes et les cellules épithéliales mammaires comme étant un maillon essentiel de l'axe intégrine-microtubule permettant d'ancrer et de stabiliser le réseau de microtubules aux FAs (Akhtar and Streuli, 2013; Wickstrom et al., 2010a). Pour notre part, des immunofluorescences de la  $\beta$ -tubuline révèlent que comparativement aux réseaux de microtubules généralement bien développés des cellules HIEC siCNS (Figure 21I), les cellules HIEC siILK présentent habituellement des réseaux de microtubules plus compacts et des

accumulations périphériques de la  $\beta$ -tubuline (Figure 21I vs 21J). Cela indique donc que l'expression de l'ILK est requise pour l'intégrité du réseau de microtubules chez les cellules HIEC. Toutefois, nous pouvons difficilement évaluer si ces altérations découlent directement de la perte de l'ILK sur l'ancrage membranaire des microtubules et l'axe intégrine-microtubule ou si elles sont simplement une conséquence des altérations de l'étalement et des structures de l'axe intégrine-actine que nous avons précédemment décrites.

Les caractéristiques des structures de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK en migration ont également été comparées afin d'analyser plus en détail comment l'inhibition de l'expression de l'ILK affecte la migration de ce modèle cellulaire. Pour ces expériences des populations confluentes de ces cellules étaient blessées, puis cultivées normalement pendant approximativement 18 heures avant que la vinculine et l'actine-F (visualisée avec la phalloïdine-TRITC) des cellules en migration soient observées en immunofluorescence. Les images de microscopie révèlent que plusieurs des cellules HIEC siCNS en migration possèdent une morphologie très étirée et forment de longues fibres de stress ventrales pouvant relier les FAs d'une extrémité à l'autre de ces cellules (Figures 22A et 22C). Ces caractéristiques sont représentatives d'un déplacement cellulaire par contraction qui nécessite généralement une adhésion cellulaire ferme sur un substrat suffisamment rigide, de même que la stimulation RhoA-dépendante de l'activité contractile des structures d'actomyosine (Friedl and Wolf, 2010; Schmidt and Friedl, 2010). À l'opposé, les cellules HIEC siILK en migration possèdent une morphologie beaucoup plus compacte et elles assemblent généralement des réseaux de microfilaments d'actine de type orthogonal au sein de lamellipode frontal (c.-à-d. du côté de la migration) (Figures 22B et 22D). Ces caractéristiques suggèrent un déplacement cellulaire Rac1-dépendant plus lent de type protrusif par les lamellipodes. Ce mode de migration cellulaire est habituellement exécuté sur un substrat d'adhésion peu rigide ou soutenant peu l'adhésion cellulaire par les intégrines (Friedl and Wolf, 2010). De plus, puisqu'il est connu que la force du lien adhésif entre les cellules et la MEC est typiquement proportionnelle à la densité des complexes intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine formés au niveau de l'interface cellule/MEC (Garcia et al., 1998b; Roca-Cusachs et al., 2009; Shi and Boettiger, 2003), le mode de migration adopté par les cellules HIEC siILK s'accorde avec nos résultats précédents démontrant que l'impact négatif de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur la migration de ces cellules est indirect et qu'il serait causé par l'arrêt de la déposition de la fibronectine endogène dans ce contexte.

Figure 22 : L'inhibition de l'expression de l'ILK altère l'organisation des structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC en migration

(A-D) Photos d'épifluorescence représentatives du réseau de microfilaments d'actine (visualisé avec la phalloïdine-TRITC et colorée numériquement en vert) et de la vinculine (colorées numériquement en rouge) chez (A) des cellules HIEC siCNS et (B) des cellules HIEC siILK en migration 18 heures après la formation des blessures. (C) Agrandissement de la zone C encadrée en A et (D) agrandissement de la zone D encadré en B. (A-D) Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : (A et B) en A: 20  $\mu$ m.

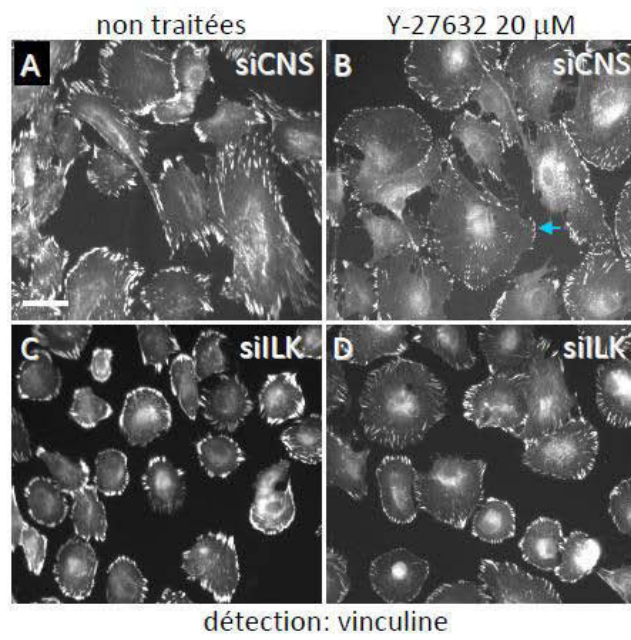


**Figure 22**

Afin de vérifier si l'entrave au développement des structures de l'axe MEC-intégrine-actine en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK pourrait être associée à une diminution de l'activité de la voie RhoA/ROCK, nous avons comparé les effets de l'inhibition de ROCK sur l'organisation de cet axe chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Nous avons d'abord analysé les caractéristiques des FAs par la détection de la vinculine en immunofluorescence chez des cellules cultivées 16 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées 24 heures supplémentaires sans traitement ou en présence de 20  $\mu$ M de l'inhibiteur pharmacologique Y-27632 ciblant spécifiquement l'activité de ROCK. Il est à noter que des travaux de recherches publiés par le laboratoire du Pr Beaulieu ont précédemment démontré l'efficacité du Y-27632 pour l'inhibition de la phosphorylation de la <sup>S19</sup>MLC par ROCK — donc de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC — et de l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine chez les cellules HIEC (Benoit et al., 2009; Groulx et al., 2011). Ainsi, comparativement aux cellules HIEC siCNS non traitées qui assemblent plusieurs structures d'adhésion allongées typiques des FAs matures (Figure 23A), les cellules HIEC siCNS traitées avec l'inhibiteur Y-27632 présentent généralement des structures d'adhésion périphériques plus petites de type FX (Figure 23B). Ces résultats confirment que chez les cellules HIEC les fonctions de ROCK sont importantes pour la formation des FAs. Fait à noter, les cellules HIEC siCNS demeurent bien étalées suite à l'inhibition de ROCK et de façon générale l'aire d'étalement des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK traitées avec le Y-27632 semble supérieure à celui des cellules respectives non traitées (Figure 23B vs 23A et 23D vs 23C). Ensuite, comparativement aux cellules HIEC siILK non traitées (Figure 23C), nous n'observons pas de changement évident des caractéristiques des FXs et des FAs immatures assemblés par les cellules HIEC siILK traitées avec le Y-27632 (Figure 23D). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la voie RhoA/ROCK est peu active ou inactive chez les cellules HIEC siILK. Ainsi, l'entrave au développement des FAs matures de type tardif chez ces cellules pourrait bien être causée par une diminution de l'activité de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC. De plus, puisqu'il semble qu'en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK les fonctions de ROCK ne soient pas requises pour l'élaboration des FAs de type précoce, cela suggère que dans ces conditions une autre voie de signalisation contribuerait à induire la formation de ce type de structures à partir des FXs préexistants.

Figure 23 : L'inhibition de ROCK entrave le développement des FAs chez les cellules HIEC siCNS, mais n'empêche pas la formation des FAs chez les cellules HIEC siILK

(A-D) Photos d'immunofluorescence représentatives de la vinculine chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 16 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées 24 heures supplémentaires soit sans traitement ou en présence de 20  $\mu$ M de l'inhibiteur pharmacologique Y-27632 de l'activité de ROCK. (A et B) L'inhibition de ROCK empêche la formation des FAs uniquement chez les cellules HIEC siCNS, qui forment alors principalement des FXs en périphérie de leur aire d'étalement (ex. pointé par la flèche bleue en B). (C et D) L'inhibition de ROCK chez les cellules HIEC siILK ne semble pas affecter la capacité de ces cellules à former des FAs immatures de type précoce. Barre d'échelle : (A-D) en A: 40  $\mu$ m.



**Figure 23**

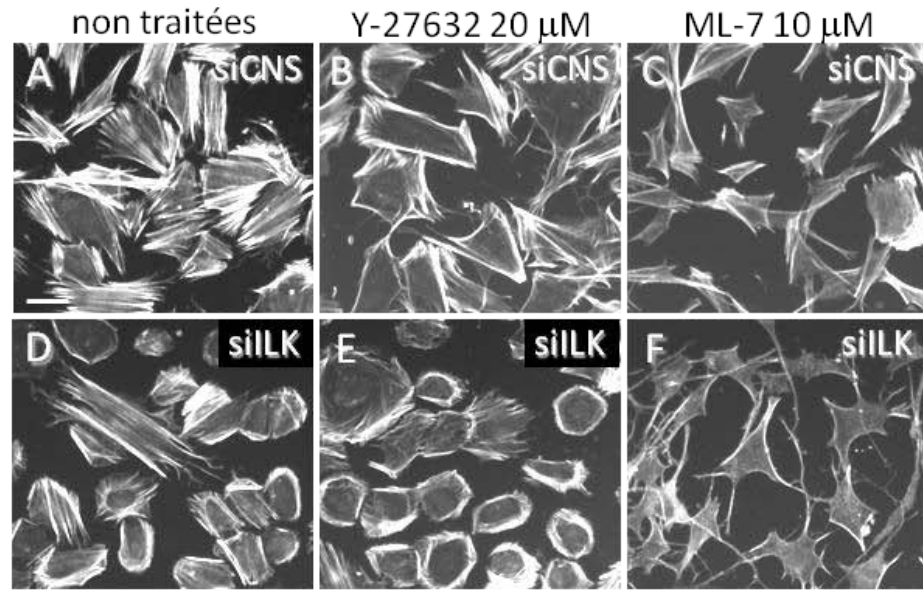
Plusieurs travaux de recherches indiquent que la MLCK — qui est une autre kinase qui a la capacité de phosphoryler la sérine 19 de la MLC ( $p^{S19}$ MLC) — serait surtout impliquée dans l'assemblage de l'actine corticale et des fibres de stress dorsales en périphérie de l'aire d'étalement des cellules (Kato et al., 2010; Katsumi et al., 2002; Totsukawa et al., 2004; Totsukawa et al., 2000). Dans cette optique, nous avons comparé les effets de l'inhibition spécifique de ROCK avec 20  $\mu$ M de Y-27632 et de l'inhibition spécifique de la MLCK avec 10  $\mu$ M de ML-7 sur l'organisation du cytosquelette d'actine (visualisée avec la phalloïdine-TRITC) des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK préalablement ensemencées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture. Il est à noter que les travaux de recherches de Groulx et coll. (2011) ont démontré que l'inhibiteur pharmacologique ML-7 a normalement peu d'effet sur les niveaux de  $p^{S19}$ MLC chez les cellules HIEC, mais qu'il peut inhiber efficacement la voie MLCK/ $p^{S19}$ MLC lorsque l'activité de cette voie est stimulée par l'inhibition de l'expression du collagène VI chez ce modèle cellulaire (Groulx et al., 2011). Nos résultats indiquent d'abord que l'élaboration des fibres de stress ventrales parallèles est fortement réprimée chez les cellules HIEC siCNS traitées avec le Y-27632 (Figure 24B vs 24A). Cependant, l'inhibition isolée de ROCK ne peut empêcher la formation de fibres de stress cortical chez les cellules HIEC siCNS (Figure 24B). Cela confirme donc que chez ce modèle cellulaire les fonctions de la voie RhoA/ROCK sont cruciales dans le développement et la maturation des structures de l'axe intégrine-actine représentatives du phénotype cellulaire contractile. L'inhibition de ROCK chez les cellules HIEC siILK ne semble pas altérer l'organisation du cytosquelette d'actine comparativement aux cellules HIEC siILK non traitées (Figure 24E vs 24D). Ainsi, cela indique que les fonctions de ROCK sont facultatives dans l'assemblage des réseaux orthogonaux et corticaux de microfilaments d'actine des cellules HIEC siILK.

D'autre part, l'inhibition de la MLCK empêche également l'élaboration des fibres de stress ventrales dans la région centrale des cellules HIEC siCNS (Figure 24C). Toutefois, l'inhibition de la MLCK est insuffisante pour induire une morphologie arrondie chez les cellules HIEC siCNS et de façon générale, ces cellules montrent une altération évidente de leur étalement et une morphologie irrégulière comparativement aux cellules HIEC siCNS non traitées (Figure 24C vs 24A). De plus, les faisceaux d'actine corticale présentés par les cellules HIEC siCNS traitées avec le ML-7 sont généralement beaucoup moins développés que ceux présentés chez les cellules HIEC siCNS traitées avec le Y-27632 (Figure 24C vs 24B). Ces observations suggèrent

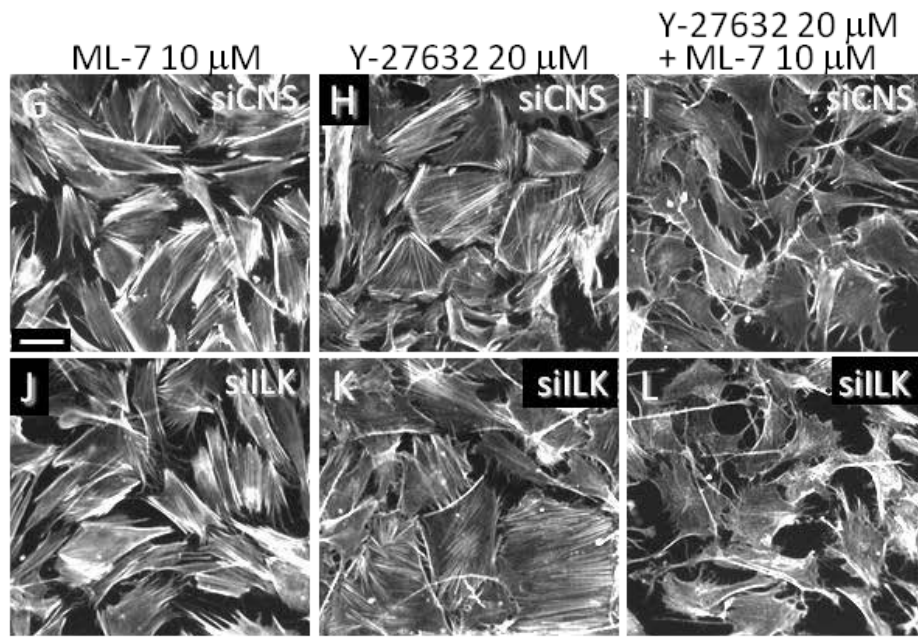


Figure 24 : Les fonctions de l'ILK dans le développement des fibres de stress ventrales des cellules HIEC dépendent des effets de la fibronectine sur la voie RhoA/ROCK

(A-F) Photos d'épifluorescence représentatives du réseau de microfilaments d'actine (détecté avec la phalloïdine-TRITC) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 24 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées durant les 24 heures suivantes soit sans traitement (non traitées), soit en présence de 20  $\mu\text{M}$  de Y-27632 afin d'inhiber ROCK ou soit en présence de 10  $\mu\text{M}$  de ML-7 (Sigma-Aldrich) afin d'inhiber la MLCK. (G-L) Photos d'épifluorescence représentatives du réseau de microfilaments d'actine chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 24 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène, puis cultivées sans traitement (images non présentées) ou en présence de soit 10  $\mu\text{M}$  de ML-7 uniquement, soit 20  $\mu\text{M}$  de Y-27632 uniquement ou soit la combinaison de ces deux inhibiteurs. Barres d'échelle (A-F) en A : 40  $\mu\text{M}$ ; (G-L) en G : 40  $\mu\text{M}$ .



surface N.R., détection: actine



FN, détection: actine

**Figure 24**

que chez les cellules HIEC les fonctions de la MLCK sont impliquées dans la régulation de l'organisation de l'axe intégrine-actine et qu'elles sont importantes pour l'intégrité du processus d'étalement de ces cellules. Puis, contrairement à ce que nous avons observé lors de l'inhibition de ROCK chez les cellules HIEC siILK, l'inhibition de la MLCK chez ces cellules bloque entièrement l'élaboration des réseaux orthogonaux et corticaux de microfilaments d'actine et empêche ces cellules d'adopter la morphologie arrondie qu'elles présentent habituellement (Figure 24F vs 24D). Les effets de l'inhibition de la MLCK sur l'organisation du cytosquelette d'actine semblent visuellement plus sévères chez les cellules HIEC siILK (Figure 24F) que chez les cellules HIEC siCNS (Figure 24C). Dans l'ensemble, ces résultats proposent que l'activité de la voie MLCK/<sup>pS19</sup>MLC contribue à l'élaboration des réseaux orthogonaux et corticaux de microfilaments d'actine qui sont associés à la morphologie épithélioïde des cellules HIEC siILK. Par conséquent, en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK, les fonctions de la MLCK seraient importantes pour l'étalement en mode isotropique, mais seraient insuffisantes afin de permettre le développement des structures matures de l'axe intégrine-actine impliquées dans le mode anisotropique de ce processus.

Lorsque des expériences équivalentes sont effectuées avec des cellules cultivées sur des lamelles de verre prétraitées avec de la fibronectine exogène, la formation de fibres de stress ventrales se rétablit chez les cellules HIEC siILK et l'organisation de l'actine dans chaque condition est globalement équivalente chez les HIEC siCNS et HIEC siILK. Plus précisément, chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK qui adhèrent sur la fibronectine exogène : 1) l'inhibition isolée de la MLCK par le ML-7 n'empêche pas le cytosquelette d'actine de ces cellules de présenter globalement les mêmes caractéristiques contractiles que celles présentées par le cytosquelette d'actine des cellules HIEC siCNS cultivées sans traitement sur une surface N.R. (Figures 24G et 24J vs 24A); 2) l'inhibition isolée de ROCK par le Y-27632 n'empêche pas la formation de fibres de stress ventrales parallèles, mais altère leur disposition et l'organisation générale du cytosquelette d'actine (Figures 24H et 24K); et 3) seule l'inhibition simultanée de la MLCK et de ROCK permet de bloquer la formation des fibres de stress d'actine. Toutefois, l'inhibition simultanée de ces deux kinases est associée à de fortes perturbations de l'architecture de la membrane plasmique périphérique et de la morphologie des cellules des deux populations cellulaires expérimentales (Figures 24I et 24L). Ces résultats importants démontrent qu'indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC, l'adhésion de ces cellules

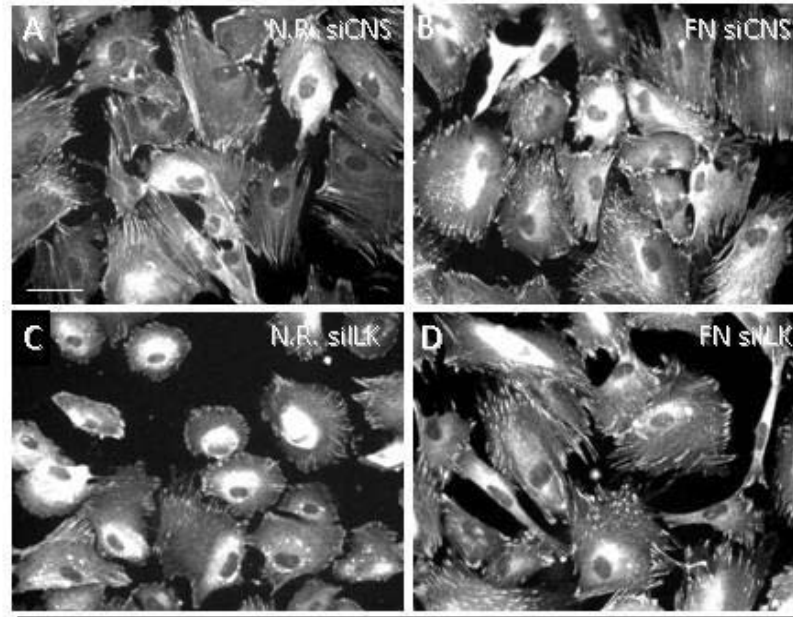
sur un substrat de fibronectine exogène est suffisante pour permettre à la voie RhoA/ROCK/ $p^{S19}$ MLC et à la voie MLCK/ $p^{S19}$ MLC d'induire la formation de fibres de stress ventrales. Cependant, seule la voie RhoA/ROCK/ $p^{S19}$ MLC permet la formation d'un réseau de fibres de stress ventrale parallèles comparable à celui observé chez les cellules HIEC siCNS sur une surface N.R.

### *3.3.2 Le rôle de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine stimule l'élaboration RhoA-dépendante des fibres de stress ventrales et des FAs matures chez les cellules HIEC*

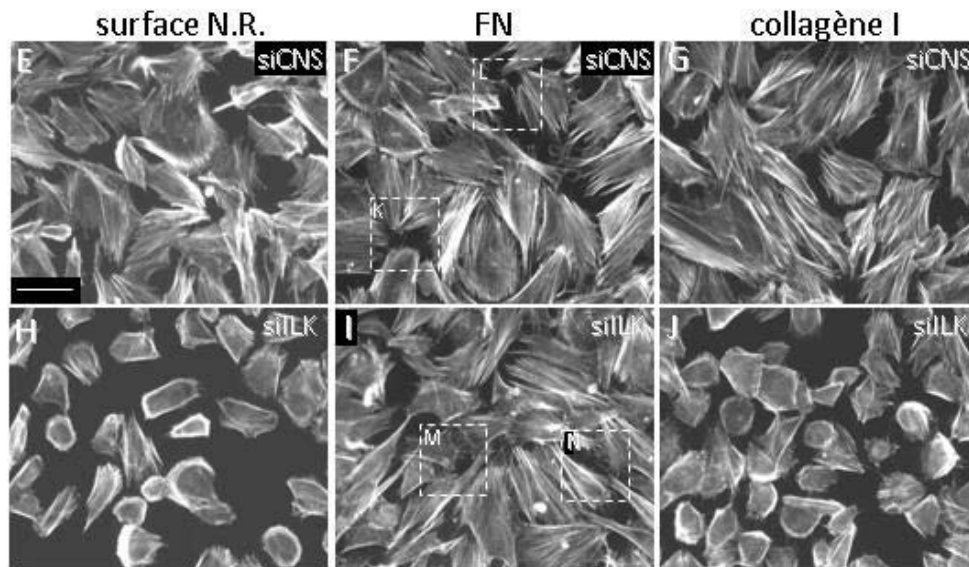
Différentes recherches indiquent que l'ILK et les parvines peuvent interagir directement et indirectement avec la paxilline (Boulter and Van Obberghen-Schilling, 2006; Morgan et al., 2009; Nikolopoulos and Turner, 2001; Nikolopoulos and Turner, 2002; Stiegler et al., 2012). Il a de plus été suggéré que ces interactions permettent à la paxilline de transloquer du réticulum endoplasmique vers les FAs en formation par les vésicules de transport se déplaçant le long de l'axe intégrine-microtubule (Fielding et al., 2008b). Ainsi, afin de déterminer si l'inhibition de l'élaboration des FAs matures chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. est causée par les effets de l'inhibition de l'assemblage de la fibronectine endogène soluble ou par l'altération de l'axe intégrine-microtubule, nous avons comparé la distribution de la paxilline en immunofluorescence chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées 24 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (surface N.R.) ou avec la fibronectine exogène. Ainsi, tel que nous l'avons décrit précédemment pour la vinculine, sur une surface N.R. la paxilline est surtout détectée au niveau des FAs matures de type tardif des cellules HIEC siCNS (Figure 25A) et des FAs immatures des cellules HIEC siILK (Figure 25C). La paxilline est également détectée régulièrement de façon diffuse dans la région centrale du cytoplasme des cellules HIEC siILK. Toutefois, lorsque ces dernières cellules adhèrent à un substrat de fibronectine exogène, toutes ces altérations de la distribution de la paxilline sont complètement secourues malgré l'inhibition de l'expression de l'ILK (Figure 25D vs 25B). De plus, des résultats équivalents ont été obtenus grâce à la détection de la vinculine dans les mêmes conditions (données non présentées). L'adhésion sur la fibronectine exogène permet donc de court-circuiter les fonctions de l'ILK qui sont nécessaires pour le développement des FAs

Figure 25 : Le rôle de l'ILK permettant le développement des fibres de stress ventrales peut être secouru par l'adhésion des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène

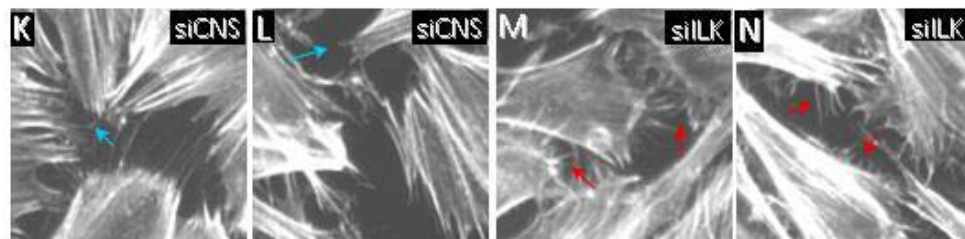
(A-D) Photos d'immunofluorescence représentatives de la paxilline chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 24 heures au préalable sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu (N.R.) ou avec 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). (E-J) Photos d'épifluorescence représentatives du réseau de microfilaments d'actine (détecté avec la phalloïdine-TRITC) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK dans les mêmes conditions (N.R. et FN), de même que lorsque ces cellules sont initialement ensemencées sur des lamelles de verre prétraitées avec 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de collagène I exogène (collagène I). (K et L) Agrandissements des zones K et L encadrées en F et montrant le prolongement de minces faisceaux d'actine à l'extrémité des fibres de stress ventrales des cellules HIEC siCNS (ex. pointés par les flèches bleues). (M et N) Agrandissements des zones M et N encadrées en I et montrant les structures atypiques formées de courts faisceaux d'actine chez les cellules HIEC siILK (ex. pointés par les flèches rouges). Barres d'échelle : (A-D) en A: 50  $\mu\text{m}$ ; (E-J) en E: 50  $\mu\text{m}$ .



détection: paxilline



détection: actine



**Figure 25**

matures et le recrutement de la paxilline et de la vinculine dans ces structures. Ces expériences démontrent que la MEC de fibronectine — et par conséquent le rôle de l'ILK dans la déposition de la fibronectine endogène soluble — est importante pour la maturation des FAs chez les cellules HIEC sur une surface N.R. Ainsi, l'inhibition de l'expression de l'ILK n'empêche pas le développement des FAs mature en altérant la capacité de l'axe intégrine-microtubule à recruter les constituants des sites d'adhésion des intégrines.

Dans la même optique, nous avons analysé l'organisation du réseau de microfilaments d'actine (visualisée en épifluorescence avec la phalloïdine-TRITC) chez les cellules HIEC siCNS et les cellules HIEC siILK ensemencées 24 heures au préalable sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (surface N.R.) ou de la fibronectine exogène. Puisque le collagène de type I (collagène I) est tout comme la fibronectine un constituant fibrillaire de base des MEC (Jensen and Host, 1997) et que cette protéine a déjà été décrite comme supportant l'adhésion et les fonctions cellulaires de plusieurs modèles des CEIs (p. ex. Caco-2/15, HT-29, IEC-6) (East et al., 1992; Vishnubhotla et al., 2007; Zhang et al., 2003a), nous avons vérifié l'organisation du cytosquelette d'actine chez des cellules cultivées dans les mêmes conditions, mais sur des lamelles de verre prétraitées avec du collagène I exogène (BD Biosciences). Les images indiquent que dans chacune des conditions d'adhésion les cellules HIEC siCNS forment plusieurs fibres de stress ventrales parallèles (Figures 25E à 25G) et que l'organisation générale des fibres de stress semble relativement plus élaborée chez les cellules qui adhèrent sur la fibronectine exogène ou le collagène I exogène (Figures 25F et 25G vs 25E). Cela démontre que la MEC endogène et les substrats exogènes de fibronectine et de collagène I peuvent supporter le phénotype contractile des cellules HIEC siCNS. Ensuite, comparativement à l'organisation du cytosquelette d'actine présentée par les cellules HIEC siILK cultivées sur le collagène I qui se rapproche de l'organisation précontractile observée lorsque ces cellules sont cultivées sur une surface N.R. (Figure 25J vs 25H), les cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène présentent une organisation de l'actine-F globalement comparable de l'organisation contractile observée chez les cellules HIEC siCNS servant de contrôle (Figure 25I vs 25F). D'autre part, des expériences analogues ont permis de déterminer que contrairement au substrat de fibronectine exogène adsorbée, la fibronectine exogène ajoutée dans le milieu des cellules HIEC siILK précultivées 24 heures sur le plastique N.R. des pétris ne permet pas de rétablir le phénotype contractile de ces cellules (images non présentées). Considérant que dans ces conditions

l'adsorption de la fibronectine exogène ajoutée au milieu de ces cellules est en principe empêchée par l'occupation préalable des sites chargés de la surface des pétris par les protéines du milieu (4 % sérum) (Grinnell and Feld, 1982), cela suggère que les caractéristiques de la fibronectine exogène adsorbées seraient importantes dans le rétablissement de l'organisation contractile du cytosquelette d'actine en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK.

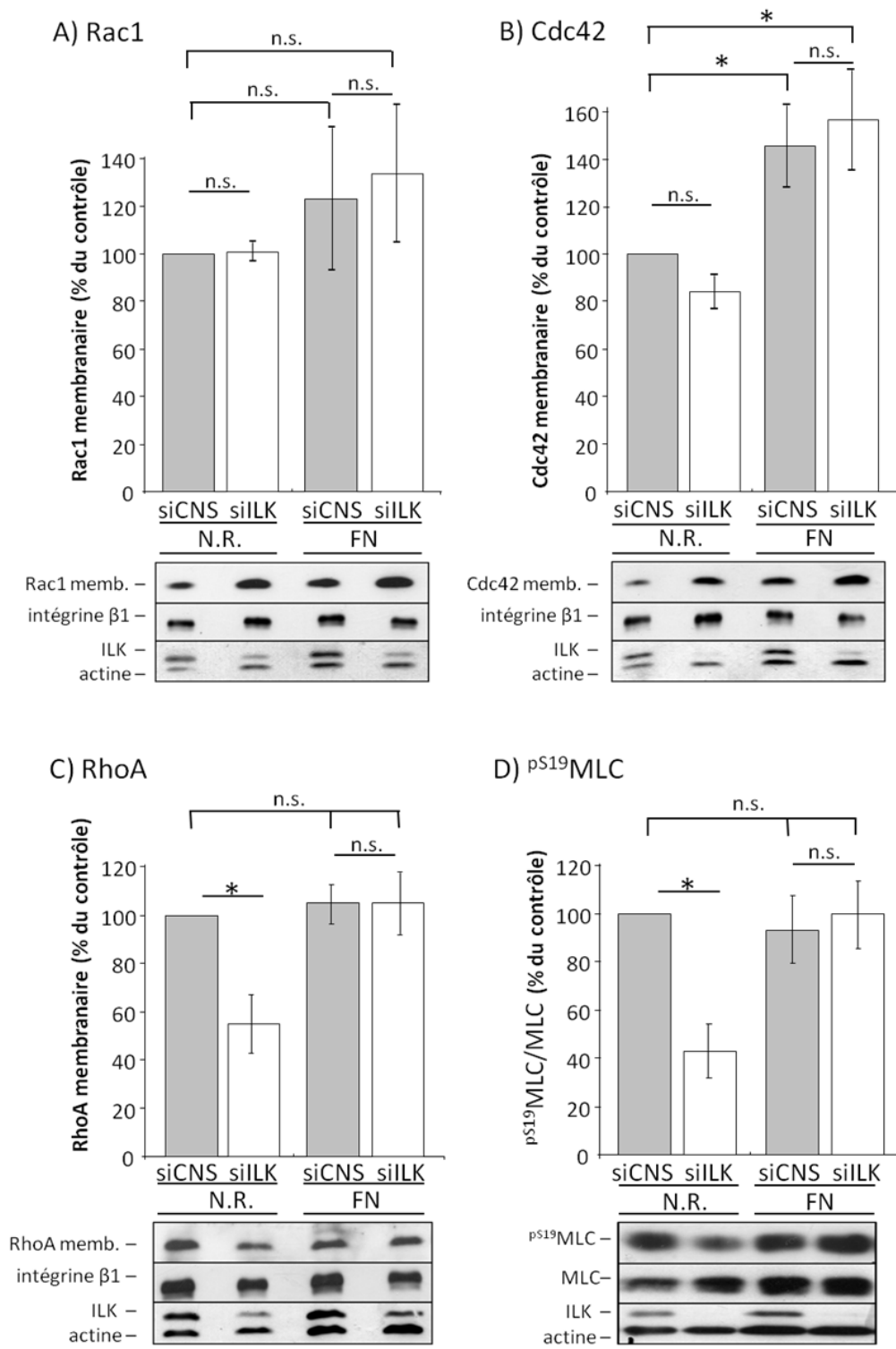
D'autre part, contrairement aux cellules HIEC siCNS sur la fibronectine exogène qui présentent de minces faisceaux d'actine-F prolongeant les fibres de stress ventrales (Figures 25K et 25L) et qui sont possiblement impliqués dans la formation des filopodes, les cellules HIEC siILK dans la même condition d'adhésion présentent souvent en de courts faisceaux d'actine-F orientés de façon perpendiculaire aux fibres de stress sous-membranaires en périphérie de l'aire d'étalement (Figures 25M et 25N). L'observation de ce type de structures atypiques en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK suggère l'ILK et le complexe PIP participent à la régulation de l'organisation de l'actine-F périphérique chez les cellules HIEC qui adhèrent sur la fibronectine. Ce rôle pourrait par exemple empêcher la formation des protrusions membranaires périphériques anormales.

L'architecture du cytosquelette d'actine est principalement gouvernée par l'activité des Rho GTPases et plusieurs recherches indiquent que les membres du complexe PIP contribuent par leurs interactions à réguler l'activité des Rho GTPases (Boulter and Van Obberghen-Schilling, 2006; Gonzalez-Nieves et al., 2013; Schotman et al., 2009; Wickstrom et al., 2010b). Nous avons donc comparé l'activité de RhoA, de Rac1 et de Cdc42 chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK adhérentes sur la surface des pétris (N.R.) ou sur un substrat de fibronectine exogène. L'activité de ces Rho GTPases était évaluée en déterminant par immunobuvardage la proportion de RhoA, de Rac1 et de Cdc42 membranaire détectée dans les fractions membranaires isolées de lysats des cellules HIEC siCNS et siILK (Benoit et al., 2009; Zargham et al., 2007). En premier lieu, nos analyses révèlent que les cellules HIEC siCNS et les cellules HIEC siILK montrent des proportions de Rac1 et de Cdc42 membranaires statistiquement équivalentes lorsque les conditions d'adhésion sont les mêmes (Figure 26A et 26B; N.R.: siCNS vs siILK et FN: siCNS vs siILK). Ces résultats indiquent qu'indépendamment du substrat d'adhésion, l'expression de l'ILK n'est pas un facteur déterminant dans la régulation de l'activité de Rac1 et de Cdc42 chez les cellules HIEC. Néanmoins, il est à préciser que les proportions de Rac1 et de Cdc42 membranaires ont tendance à être plus élevées lorsque ces cellules adhèrent sur la



Figure 26 : L'adhésion des cellules HIEC sur la fibronectine exogène soutient l'activation de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC indépendamment de l'expression de l'ILK

(A-C) Histogrammes des quantités relatives de (A) Rac1, (B) Cdc42 et (C) RhoA dans les fractions membranaires cellulaires isolées de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 48 heures au préalable directement à la surface des pétris (N.R.) ou sur 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène adsorbée (FN). Pour chaque condition les résultats représentent le rapport des valeurs obtenues par l'analyse densitométrique des immunobuvardages de chacune de ces trois Rho GTPases au sein de fractions membranaires extraites des lysats cellulaires sur les valeurs respectives de leur détection dans les extraits protéiques totaux de ces lysats. Les quantités de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines détectées dans les extraits protéiques totaux ont été utilisées comme contrôle protéique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (N.R., siCNS)  $\pm$  l'erreur standard et pour chaque condition l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \* =  $p < 0.05$ , n.s.= p non significatif). (D) Histogramme des quantités relatives de <sup>pS19</sup>MLC détectées par immunobuvardage chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 48 heures au préalable directement à la surface des pétris (N.R.) ou sur la fibronectine exogène (FN). Les valeurs obtenues de l'analyse densitométrique des niveaux de <sup>pS19</sup>MLC ont été normalisées en fonction des niveaux totaux de MLC détectés dans les mêmes échantillons. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (N.R., siCNS)  $\pm$  l'erreur standard et l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \* =  $p < 0.05$ , n.s.= p non significatif). Les images sous les histogrammes présentent des immunobuvardages représentatifs.



**Figure 26**

fibronectine. D'ailleurs, les cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène montrent des quantités de Cdc42 membranaires statistiquement supérieures de celles des cellules HIEC siCNS sur une surface N.R (Figure 26B, FN/siILK vs N.R./siCNS). Par conséquent, cela propose que l'ILK et/ou le complexe PIP soient impliqués dans l'inhibition de l'activité de Cdc42 chez les cellules HIEC adhérentes sur la fibronectine.

Nos analyses indiquent également que les cellules HIEC siILK sur une surface N.R. présentent une diminution substantielle de la proportion de RhoA membranaire comparativement aux cellules HIEC siCNS (Figure 26C, N.R./siILK vs N.R./siCNS). Cependant, l'adhésion des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène permet de rétablir chez ces dernières la proportion de RhoA membranaire au niveau détecté chez les cellules HIEC siCNS (Figure 26C, FN/siILK vs FN/siCNS et N.R./siCNS). Il est à noter que la MEC de fibronectine endogène et le substrat de fibronectine exogène stimulent les niveaux de RhoA membranaire de façon équivalente chez les cellules HIEC siCNS (Figure 26C, FN/siCNS vs N.R./siCNS). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent qu'indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC, l'activité de RhoA est stimulée de façon efficace lorsque ces cellules adhèrent sur la fibronectine. Nos données tendent ainsi à démontrer que la contribution principale de l'ILK dans l'activation optimale de RhoA chez les cellules HIEC est indirecte et découle du rôle de cette protéine dans le processus de déposition/assemblage de la fibronectine.

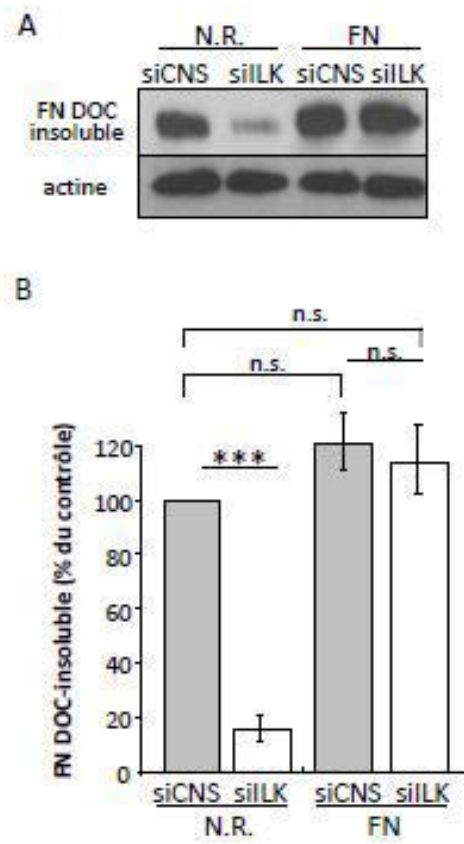
Plusieurs travaux de recherches rapportent que l'ILK régule la contractilité cellulaire par des fonctions intracellulaires permettant de contrôler directement ou indirectement les niveaux de <sup>pS19</sup>MLC (Barker et al., 2005; Deng et al., 2002; Huang et al., 2006; Khyrul et al., 2004; Kiss et al., 2002; Kogata et al., 2009; Maier et al., 2008; Muranyi et al., 2002; Pereira et al., 2009). Considérant ces informations nous avons analysé l'implication de l'ILK, de la fibronectine et de la voie RhoA/ROCK sur la phosphorylation la sérine 19 de la MLC en comparant les niveaux de <sup>pS19</sup>MLC aux niveaux totaux de MLC détectés par immunobuvardage chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur le plastique des pétris (N.R.) ou sur la fibronectine exogène. D'abord, ces expériences indiquent que l'inhibition de l'expression de l'ILK et l'adhésion des cellules sur la fibronectine n'affectent pas les niveaux totaux de la protéine MLC (données non présentées). Puis, les valeurs obtenues pour les ratios <sup>pS19</sup>MLC/MLC calculés à partir des données de l'analyse densitométrique des immunobuvardages révèlent que les niveaux de <sup>pS19</sup>MLC détectés chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK suivent globalement les niveaux

de RhoA membranaire respectifs dans les mêmes conditions d'adhésion (Figure 26D vs 26C). Ces résultats démontrent donc qu'indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC, les effets stimulants de l'adhésion sur la fibronectine sur l'activité de la voie RhoA/ROCK se transposent en phosphorylation de la sérine 19 de la MLC. Puisque ces dernières données appuient nos données précédentes, cela suggère d'autant plus que l'implication de l'ILK dans la stimulation de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC précède les événements de type *outside-in* contrôlant l'activité de RhoA. La contribution de l'ILK dans l'activation de cette voie émane donc selon toute vraisemblance de son implication pour le processus de déposition/assemblage de la fibronectine. Ces résultats s'accordent donc avec ceux de Groulx et coll. (2011) rapportant que l'adhésion sur la fibronectine active la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC des cellules HIEC (Groulx et al., 2011).

Les mécanismes de mécanosensation associés aux sites d'adhésion cellulaires modulent en permanence l'activité mécanodépendante de RhoA afin que les forces de tensions développées le long de l'axe MEC-intégrine-actine soient en équilibre avec la capacité des structures et des interfaces de cet axe à supporter cette tension (Gardel et al., 2010; Moore et al., 2010). Or, les propriétés biomécaniques de la MEC (rigidité vs élasticité) sont dictées en bonne partie par le réseau de fibronectine fibrillaire de la MEC (Hocking et al., 2000; Schwartz, 2010). Considérant ces informations, nous avons évalué la capacité des cellules HIEC siILK à assembler le substrat de fibronectine exogène en matrice de fibronectine fibrillaire. Pour ce faire, nous avons comparé par immunobuvardage les quantités de fibronectines fibrillaires insolubles au désoxycholate (DOC) assemblées par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 48 heures sur le plastique N.R. des pétris ou sur un substrat de fibronectine exogène. D'abord, conformément à la diminution de la fibronectine que nous avons précédemment détecté dans la MEC des cellules HIEC siILK, ces expériences révèlent une réduction importante des quantités de fibronectines insolubles au DOC chez les cellules HIEC siILK sur une surface N.R. comparativement aux cellules HIEC siCNS servant de contrôle (Figures 27A et 27B, N.R./siILK vs N.R./siCNS). Puis, de façon remarquable des niveaux statistiquement équivalents de fibronectine insoluble au DOC sont détectés chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK adhérentes au substrat de fibronectine exogène (Figures 27A et 27B, FN/siCNS vs FN/siILK) et chez les cellules HIEC siCNS sur une surface N.R. (Figures 27A et 27B, FN/siCNS et FN/siILK vs N.R./siCNS). Ces résultats démontrent que les cellules HIEC qui adhèrent au substrat de

Figure 27 : L'adhésion sur la fibronectine exogène induit la fibrillogénèse de la fibronectine indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC

(A) Immunobuvardages représentatifs de la fibronectine insoluble au détergent désoxycholate (DOC) assemblée par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK 48 heures après qu'elles aient étéensemencées directement sur la surface non recouverte des pétis (N.R.) ou sur 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène adsorbée (FN). Le substrat de fibronectine exogène adsorbée sans cellule en culture ne permet pas d'isoler de fibronectine fibrillaire insoluble au DOC (non présentées). (B) Histogramme des quantités relatives de la fibronectine insoluble au DOC assemblé par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (siCNS)  $\pm$  l'erreur standard et ont été calculés à partir de l'analyse densitométrique des immunobuvardages de la fibronectine insoluble au DOC. Pour chaque gène l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ , n.s. = p non significatif).



**Figure 27**

fibronectine exogène assemblent efficacement une MEC de fibronectine fibrillaire, et ce, indépendamment de l'expression de l'ILK.

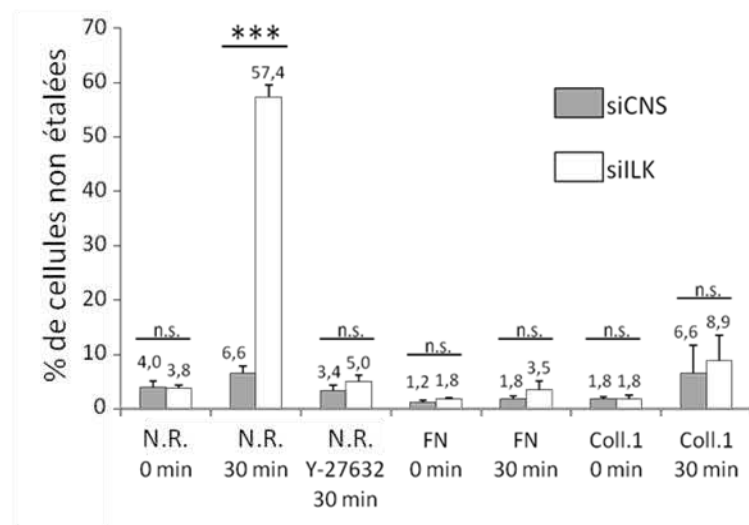
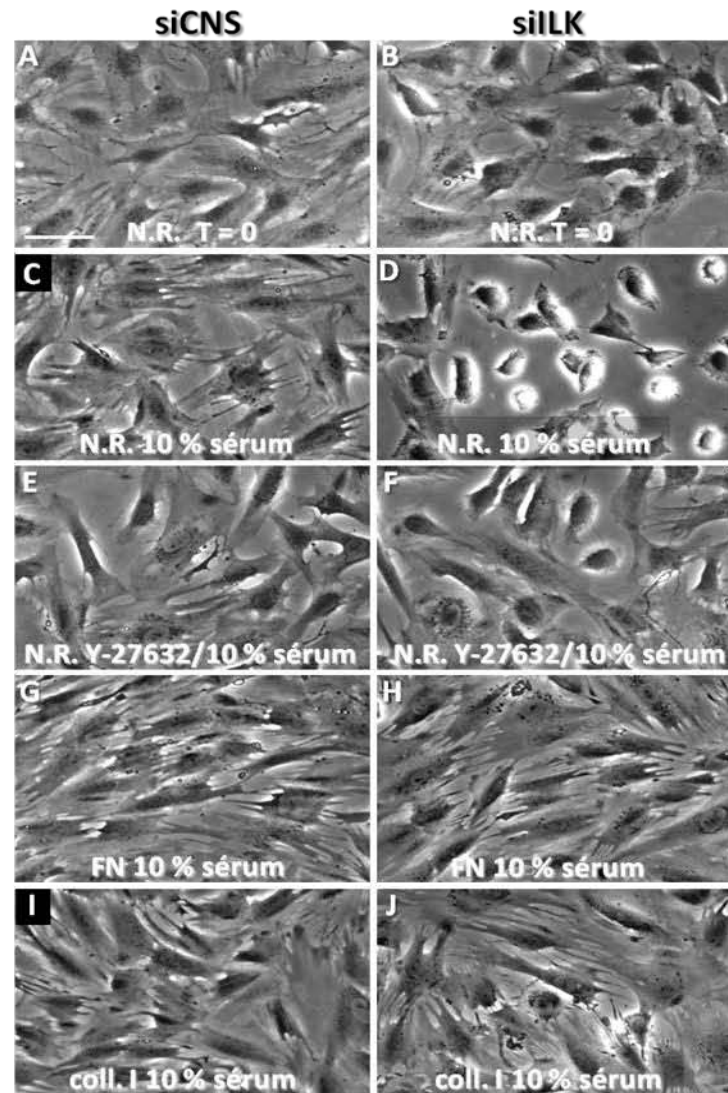
Nonobstant ces derniers résultats, le recrutement du complexe PIP au niveau des sites d'adhésion en formation est habituellement considéré dans la littérature comme une étape cruciale dans la stabilisation mécanique du lien physique formant l'interface entre le domaine cytoplasmique des intégrines et le réseau d'actine (Ghatak et al., 2013; Wickstrom et al., 2010b). Tenant compte de ces informations, nous avons comparé la capacité mécanique des constituants de l'axe MEC-intégrine-actine des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK à soutenir une augmentation brusque de la contractilité cellulaire RhoA-dépendante par des essais de stimulation au sérum. Plusieurs composants du sérum — principalement l'acide lysophosphatidique et la thrombine — ont la capacité d'induire une activation forte et rapide de RhoA et de la contractilité cellulaire via d'autres types de récepteurs membranaires que les intégrines (p. ex. certains RCPGs) (Aittaleb et al., 2010; Essler et al., 1998; Ren et al., 1999). Pour ces expériences, les cellules étaient d'abord cultivées pendant 24 heures sur le plastique N.R. des pétris ou sur la fibronectine exogène en présence de milieu de culture normal (4 % FBS), puis sevrées pour les 24 heures suivantes dans un milieu sans sérum. La contractilité de l'axe intégrine-actine des cellules sevrées était ensuite stimulée par le remplacement du milieu de sevrage par un milieu riche en sérum (10 % FBS). La morphologie et les caractéristiques de l'adhésion et de l'étalement des cellules étaient analysées en microscopie par contraste de phase avant et après les essais de stimulation au sérum.

Les images de microscopie des cellules sevrées cultivées sur une surface N.R. et prises immédiatement avant le traitement avec le sérum révèlent que dans ces conditions la morphologie des cellules HIEC siILK se rapproche de celles des cellules HIEC siCNS, bien que généralement ces dernières demeurent visuellement mieux étalées que les cellules HIEC siILK (Figure 28A vs 28B). Le compte des cellules attachées, mais qui ne sont pas étalées indique que les HIEC siCNS et HIEC siILK sevrées présentent des pourcentages de cellules non étalées équivalents et relativement bas en condition de sevrage ( $4.0 \% \pm 1.1$  de cellules HIEC siCNS non étalées à 0 min (avant le traitement) vs  $3.8 \% \pm 0.6$  de cellules HIEC siILK non étalées à 0 min,  $n \geq 3$ ).

Figure 28 : Le rôle de l'ILK dans l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire stabilise l'interface cellule/MEC et permet l'étalement des cellules HIEC

Essais de stimulation de la contractilité cellulaire par le sérum. Pour ces expériences les cellules étaient cultivées sur la surface non recouverte des pétris (N.R.) ou sur la surface recouverte de fibronectine exogène (FN) ou de collagène I exogène (coll.1) des pétris, puis sevrées 24 heures avec du milieu sans sérum et finalement utilisées pour des essais de stimulation par le sérum. Le traitement des cellules sevrées avec le sérum permet de stimuler la contractilité cellulaire RhoA-dépendante. (A-J) Photos de microscopie par contraste de phase représentatives des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK sevrées pendant 24 heures avant (en A et B; T = 0) ou 30 minutes après (de C à J) l'ajout de milieu contenant 10 % de sérum FBS (10 % sérum). (E et F) Afin de confirmer l'implication de la voie RhoA/ROCK dans les effets du sérum sur la contractilité cellulaire, des essais ont également été effectués en présence de 20  $\mu$ M de Y-27632 (Sigma-Aldrich) afin d'inhiber l'activité de ROCK. L'Histogramme sous les photos de microscopie présente le pourcentage de cellules non étalées pour chacune des conditions des essais de stimulation par le sérum. Chaque analyse statistique correspond à un test t avec échantillons paires ( $n \geq 3$ ; n.s. = p non significatif, \*\*\* =  $p < 0.0001$ ).

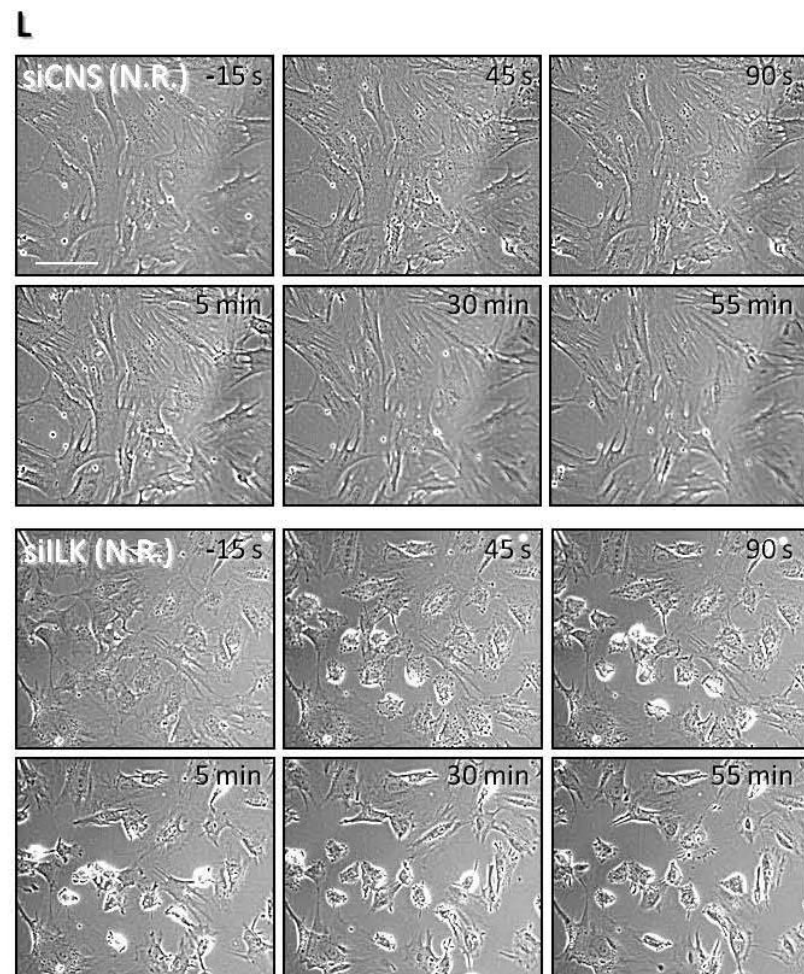
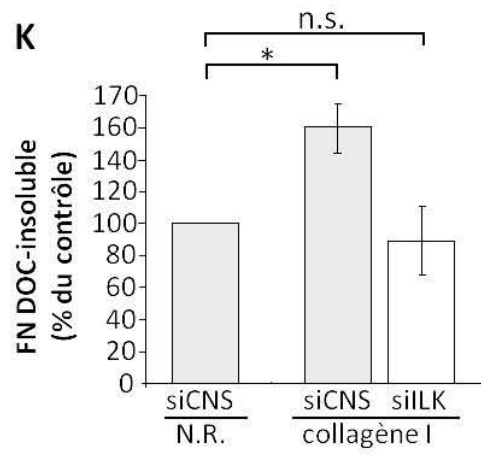




**Figure 28**

Figure 28 : Le rôle de l'ILK dans l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire stabilise l'interface cellule/MEC et permet l'étalement des cellules HIEC (suite)

(K) Histogramme des quantités relatives de la fibronectine insoluble au DOC assemblée par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 48 heures au préalable directement à la surface des pétris (N.R.) ou sur du collagène I exogène adsorbé (collagène I). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (N.R., siCNS)  $\pm$  l'erreur standard et ont été calculés à partir des données obtenues de l'analyse densitométrique des immunobuvardages de la fibronectine insoluble au DOC. Pour chaque gène l'analyse statistique correspond à un test t contre un échantillon hypothétique (représentant le contrôle) dont la valeur moyenne est de 100 ( $n \geq 3$ ; \* =  $p < 0.05$ , n.s. =  $p$  non significatif). (L) Photos de microscopie par contraste de phase des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK sur une surface N.R. lors d'essais de stimulation au sérum. Lors de ces expériences, des images ont été prises en chronophotographie (time lapse photography) toutes les 15 secondes pendant 60 minutes. Les images présentées ont été prises immédiatement avant (-15 s; cellules sevrées) et jusqu'à 55 minutes après (45 s, 90 s, 5 min, 30 min et 55 min) l'ajout du milieu contenant 10 % de sérum. Les images montrent clairement le collapse rapide de la membrane plasmique périphérique des cellules HIEC siILK suivant leur stimulation dans ces conditions (45 s, 90 s et 5 min) et révèlent que ces cellules entreprennent progressivement de se ré-étaler par la suite (30 min et 55 min). Barres d'échelle : (A-J) en A : 50  $\mu\text{m}$ ; (K) sur l'image siCNS de -15 s : 80  $\mu\text{m}$ .



**Figure 28**

Les images prises 30 minutes après l'ajout du milieu riche en sérum révèlent que dans ces conditions plusieurs des cellules HIEC siCNS présentent une rétraction partielle de leur membrane plasmique entre les sites soutenant l'adhésion cellule-MEC périphérique (Figure 28C, siCNS). Malgré ce phénomène, la plupart de ces cellules demeurent étalées ou partiellement étalées ( $6.6 \% \pm 1.3$  de cellules HIEC siCNS non étalées à 30 min,  $n \geq 3$ ). En contrepartie, nous observons que plus de la moitié de la population de cellules HIEC siILK soumises aux essais de stimulation au sérum subit un collapse intégral de leur membrane plasmique périphérique (Figure 28D;  $57.4 \% \pm 2.3$  de cellules HIEC siILK non étalées à 30 min,  $n \geq 3$ ). Mentionnons que des observations faites jusqu'à 300 minutes après l'ajout du sérum ont montré que les cellules HIEC siILK subissant ce phénomène demeurent attachées au support et se ré-étalent progressivement par la suite (images non présentées). Ces données suggèrent fortement qu'en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK les propriétés mécaniques de l'axe MEC-intégrine-actine ne sont pas en mesure de soutenir l'adhésion et l'étalement cellulaire suite à la stimulation des forces de tension contractile avec le sérum.

Afin de confirmer l'implication de la voie RhoA/ROCK comme voie médiatrice des effets du sérum sur la morphologie et l'étalement des cellules sevrées, les essais de stimulation au sérum ont également été effectués chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées sur une surface N.R. et préalablement traitées avec  $20 \mu\text{M}$  de l'inhibiteur Y-27632 afin d'inhiber ROCK. Comme prévu, dans ces conditions le phénomène de rétraction partielle de la membrane périphérique des cellules HIEC siCNS n'est pas observé (Figure 28E vs 28C) et le pourcentage de cellules non étalées demeure du même ordre que ceux observés chez les cellules HIEC siCNS sevrées ( $3.4 \% \pm 1.0$  de cellules HIEC siCNS non étalées à 30 min en présence de Y-27632,  $n \geq 3$ ). De plus, le collapse de la membrane plasmique périphérique et le désétalement des cellules HIEC siILK est empêché par l'inhibition de ROCK ( $5.0 \% \pm 1.2$  de cellules HIEC siILK non étalées à 30 min en présence de Y-27632,  $n \geq 3$ ). En effet, dans ces conditions la morphologie des cellules HIEC siILK et des cellules HIEC siCNS demeure globalement analogue (Figure 28F vs 28E). Dans cette optique, soulignons que des résultats comparables ont été obtenus lorsque les essais de stimulation au sérum étaient effectués avec des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK prétraitées avec  $5 \text{ ng/ml}$  de la toxine B du *Clostridium difficile* (données non présentées), une cytotoxine agissant comme un inhibiteur multipotent des Rho GTPases (Voth and Ballard, 2005).

Considérant l'efficacité précédemment démontrée de l'inhibiteur Y-27632 à bloquer l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC et à inhiber la phosphorylation de la <sup>S19</sup>MLC par ROCK – et donc l'activité de la voie RhoA/ROCK – chez les cellules HIEC (Benoit et al., 2009; Groulx et al., 2011), les effets des traitements avec cet inhibiteur et la toxine B confirment que le collapse des cellules HIEC siILK soumises à une stimulation avec le sérum est provoqué par une augmentation soudaine de la tension contractile RhoA-dépendante au sein de l'axe MEC-intégrine-actine.

Les effets de la stimulation par le sérum sur la morphologie et l'étalement des cellules HIEC siCNS ensemencées sur la fibronectine exogène sont similaires à ceux observés lorsque ces cellules sont initialement ensemencées sur le plastique N.R. des pétris (Figure 28G vs 28C; sur la FN exogène : 1.2 % ± 0.4 de cellules HIEC siCNS non étalées à 0 min vs 1.8 % ± 0.6 à 30 minutes, n ≥ 3). Remarquablement, le phénomène de collapse de la membrane plasmique des cellules HIEC siILK traitées avec le sérum est presque entièrement bloqué sur la fibronectine exogène (Figure 28H). Dans cette condition, les cellules HIEC siILK et les cellules HIEC siCNS traitées présentent le même type de morphologie et de rétraction partielle de la membrane plasmique entre les sites d'adhésion cellule-MEC périphérique (Figure 28H vs 28G). Nos analyses confirment également que le pourcentage de cellules HIEC siILK traitées non étalées demeure bas, et ce, malgré une légère augmentation relativement aux cellules HIEC siILK sevrées non traitées (sur la FN exogène : 1.8 % ± 0.2 de cellules HIEC siILK non étalées à 0 min vs 3.5 % ± 1.7 à 30 minutes, n ≥ 3). Considérant que : 1) nous avons précédemment établi que les cellules HIEC siILK ensemencées sur la fibronectine exogène assemblent des quantités normales de fibronectines fibrillaires, 2) que la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC des cellules HIEC siILK est secourue lorsque ces mêmes cellules adhèrent sur la fibronectine exogène, 3) que le potentiel d'activation de la contractilité cellulaire par le sérum semble intact chez les cellules HIEC siILK et 4) que la contractilité cellulaire induite par le sérum est inhibée par l'inhibiteur spécifique de ROCK Y-27632. Ces derniers résultats indiquent que l'adhésion des cellules HIEC siILK sur une MEC constituée de fibronectine fibrillaire est suffisante afin que les propriétés biomécaniques de l'axe MEC-intégrine-actine de ces cellules soutiennent l'étalement suite à l'activation brusque des forces de tension contractile RhoA/ROCK-dépendantes par le sérum. Par le fait même, cela démontre que l'expression de l'ILK et du complexe PIP n'est pas essentielle pour la stabilisation mécanique de l'interface intégrine/actine des cellules HIEC. Il

semble donc ce soit plutôt l'interface MEC/intégrine des cellules HIEC siILK sur une surface N.R. qui soit déstabilisée par l'inhibition de l'expression de l'ILK.

Afin de vérifier la spécificité des effets de la fibronectine sur l'adhésion et l'étalement des cellules HIEC siILK stimulées par le sérum, nous avons reproduit les mêmes essais avec des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK initialement ensemencées sur le collagène I exogène. Étonnamment, alors que nous avons précédemment établi que l'adhésion sur les lamelles de verre traitées avec le collagène I est incapable de supporter le développement des fibres de stress ventrales en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK (voir la figure 25J), le substrat de collagène I adsorbé sur le plastique des pétris empêche également le collapse intégral de la membrane plasmique chez la majorité des cellules HIEC siILK traitées (Figure 28J). De plus, dans cette condition les cellules HIEC siILK présentent des caractéristiques de l'étalement similaire aux cellules HIEC siCNS (Figure 28J vs 28I). Nos analyses statistiques confirment que sur le collagène I le pourcentage de cellules HIEC siILK non étalées est du même ordre que celui des cellules HIEC siCNS, et ce, que ce soit avant (sur le collagène I à 0 min :  $1.8 \pm 0.4$  de cellules HIEC siCNS non étalées vs  $1.8 \pm 0.7$  de cellules HIEC siILK non étalées,  $n \geq 3$ ) ou 30 min après le traitement (sur le collagène I à 30 min :  $6.6 \% \pm 5.1$  de cellules HIEC siCNS non étalées vs  $8.9 \% \pm 4.7$  de cellules HIEC siILK non étalées,  $n \geq 3$ ). La divergence des effets du collagène I sur le verre et sur le plastique des pétris peut s'expliquer par l'influence différente de ces deux supports matériels sur les propriétés du substrat de collagène I (Macklis et al., 1985). Néanmoins, sachant que le processus d'assemblage du collagène dans la MEC s'exécute en coopération avec celui de la fibronectine fibrillaire (Erat et al., 2009; Kadler et al., 2008; Sottile et al., 2007), nous avons vérifié si les effets du collagène I chez les cellules HIEC siILK sont associés avec un rétablissement du processus de fibrillogénèse de la fibronectine endogène en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. Pour ce faire, nous avons comparé les quantités de fibronectines fibrillaires insolubles au désoxycholate (DOC) chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK récoltées 24 heures après qu'elles eurent été ensemencées directement sur la surface N.R. de plastique des pétris ou encore sur un substrat de collagène I exogène. Les données provenant de l'analyse densitométrique des immunobuvardages révèlent que l'adhésion sur le collagène I stimule l'assemblage de la fibronectine fibrillaire chez les cellules HIEC siCNS (Figure 28K, coll. I/siCNS vs N.R./siCNS). Or, bien que les quantités de fibronectines insolubles au DOC chez les cellules HIEC siILK adhérentes sur le collagène I exogène demeurent plus faibles

que chez les cellules HIEC siCNS également sur le collagène I (Figure 28K, coll. I/siCNS vs N.R./siCNS), elles se comparent aux quantités de fibronectines fibrillaires des cellules HIEC siCNS sur une surface N.R. (Figure 28K, coll. I/siCNS vs N.R./siCNS). Les effets du collagène I permettant de soutenir l'étalement des cellules HIEC siILK lors des essais de stimulation au sérum sont donc plausiblement médiés par la capacité de ce substrat à réhabiliter la fibrillogénèse de la fibronectine endogène soluble en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. Ainsi, cela indique que l'adhésion des cellules HIEC sur le collagène I permet d'outrepasser le rôle normalement essentiel de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine endogène soluble chez ce modèle cellulaire.

Finalement, afin de mieux documenter la dynamique du collapse de la membrane plasmique périphérique en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK, une série d'analyses complémentaires a été produite en chronophotographie (*time lapse photography*) dans des conditions équivalentes chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK sur une surface N.R. Les images prises en microscopie à intervalle de 15 secondes révèlent que le collapse de la membrane plasmique périphérique des cellules HIEC siILK débute généralement de façon brusque entre la 45<sup>e</sup> seconde et la 90<sup>e</sup> seconde de stimulation et (Figure 28L, siILK : 45 s et 90 s). Il est à noter que l'intervalle de 45 à 90 secondes concorde avec ce qui est rapporté dans la littérature concernant la période où l'activité de RhoA augmente promptement lorsque d'autres types de cellules sevrées sont stimulées avec du sérum ou de l'acide lysophosphatidique (Peterson et al., 2004; Ren et al., 1999; Zhang et al., 1994). D'autre part, les images prises en chronophotographie confirment qu'après la rétraction brusque de la membrane plasmique périphérique des cellules HIEC siILK, ces dernières demeurent néanmoins attachées au pétri par leur région centrale (Figure 28L, siILK : 90 s vs 30 min). Par comparaison, comme nous l'avons déjà montré, la majorité des cellules HIEC siCNS demeurent étalées ou partiellement étalées suivant l'ajout du milieu riche en sérum (Figure 28L, siCNS). Nos observations en chronophotographie ont également révélé que lors des premières minutes suivant leur stimulation, les cellules HIEC siILK rétractées entrent rapidement dans un processus de blebbing intensif induisant des cycles de protrusions et de rétractions de leur membrane plasmique (seulement visible en chronophotographie) et qu'ensuite ces mêmes cellules entreprennent progressivement de se ré-étaler (Figure 28L, siILK : 5 min vs 30 min et 55 min). Dans ce cas, bien qu'un phénomène de blebbing membranaire RhoA/caspase-dépendant ait été précédemment

associé avec le processus d'apoptose (Coleman et al., 2001), le fait que le blebbing observé chez les cellules HIEC siILK soit transitoire et suivi par un processus de ré-étalement, exclu que le traitement avec le sérum induisent l'apoptose chez ces cellules et dans ces conditions. Considérant de plus que le blebbing membranaire est également associé aux étapes précoces du processus d'étalement symétrique de type isotropique (Dubin-Thaler et al., 2008), cela appuie par le fait même que l'expression de l'ILK est facultative pour l'exécution de la phase isotropique de l'étalement des cellules HIEC.

En résumé, les données présentées dans cette section supportent dans l'ensemble que les fonctions de l'ILK dans la maturation des structures de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC soient indirectes et qu'elles dépendent principalement du rôle spécifique de l'ILK et du complexe PIP dans la fibrillogénèse de la fibronectine endogène soluble. Puis, par les effets stimulants de la matrice de fibronectine fibrillaire sur l'activation mécanodépendante de la voie RhoA/ROCK/<sup>pS19</sup>MLC permettant d'induire l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine.

### *3.3.3 Exploration des voies de signalisation impliquées dans le développement des fibres de stress ventrales et du phénotype contractile chez les cellules HIEC*

L'ILK est considérée comme un élément important de la transduction ou de l'intégration des voies de signalisation de type *outside-in* impliquées dans la régulation des fonctions cellulaires (Legate et al., 2006; McDonald et al., 2008). Toutefois, nos résultats suggèrent plutôt que la participation de l'ILK dans la régulation de l'organisation de l'axe intégrine-actine des CEIs indifférenciées est principalement indirecte et médiée par son rôle dans la fibrillogénèse de la fibronectine. Dans ce contexte, il est intéressant et pertinent de présenter certains résultats préliminaires que nous avons obtenus d'expériences au cours desquelles nous avons inhibé pharmacologiquement l'activité des kinases Src, p38, MEK et PI3-K chez les cellules HIEC siCNS et siILK. En effet, d'une part ces kinases sont associées à des voies de signalisation permettant de réguler (en amont) et/ou de médier (en aval) les fonctions des Rho GTPases et de plusieurs constituants des FAs (Huveneers and Danen, 2009; Parsons et al., 2010; Schwartz, 2004). De plus, des recherches sur le contrôle de la survie cellulaire et de l'anoïkose principalement effectuées dans le laboratoire du Pr Vachon ont clairement démontré le rôle des intégrines dans la régulation de ces kinases chez les CEIs (Beausejour et al., 2012; Benoit et al.,

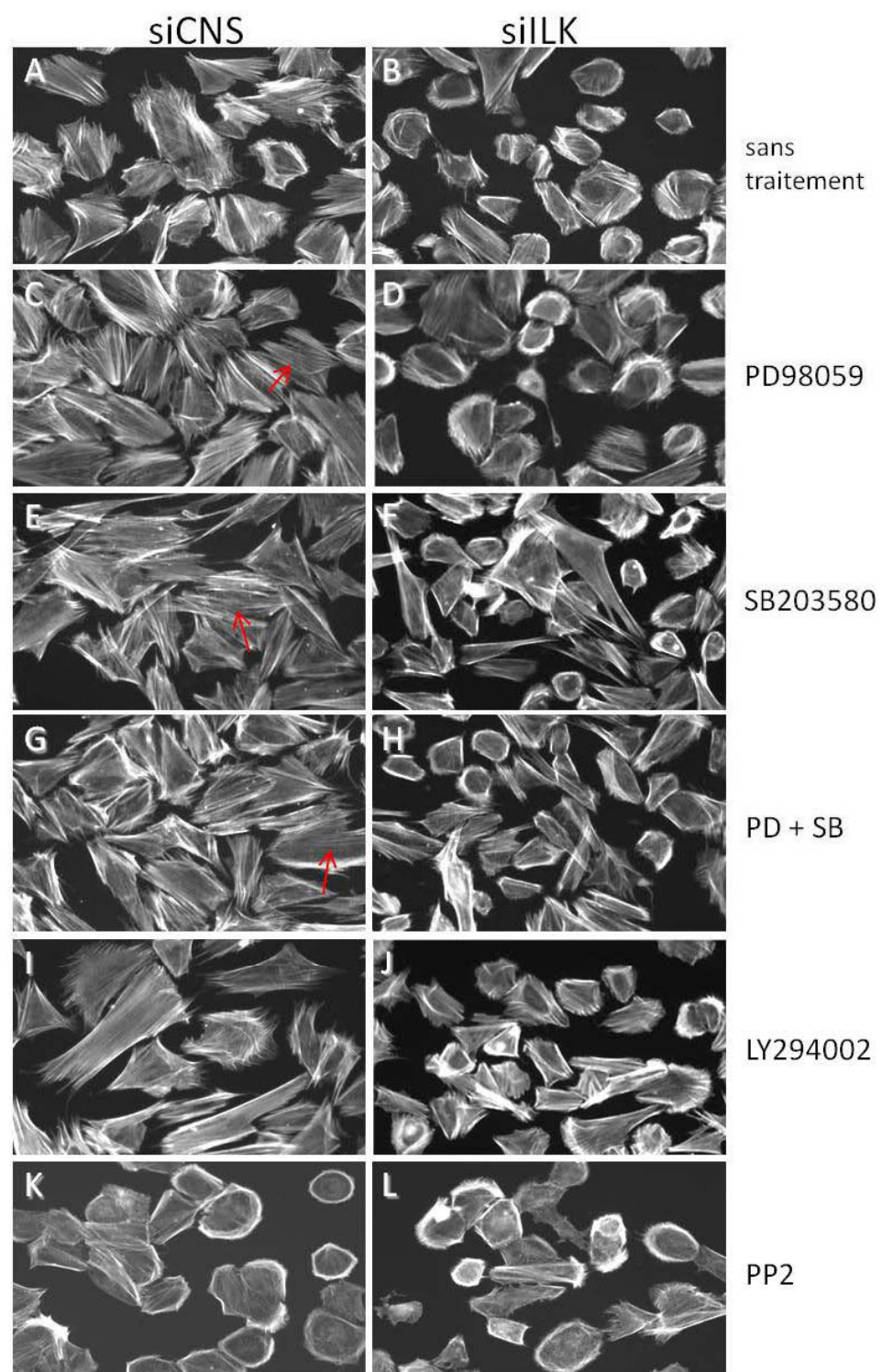


2010; Vachon, 2011). En bref, ces expériences visaient à explorer le rôle de ces kinases dans les voies de signalisation impliquées dans le développement du phénotype cellulaire contractile des cellules HIEC, de même que le ou les rôles de l'ILK et de la fibronectine dans la régulation de ces voies.

Nous avons d'abord comparé les effets de l'inhibition des kinases MEK par 20  $\mu$ M de PD98059, p38 par 20  $\mu$ M de SB203580, PI3-K par 30  $\mu$ M de LY294002 et des kinases de la famille Src (SFK; p. ex. Src, Fyn, Yes, Syk) par 20  $\mu$ M de PP2 pendant 18 heures sur le cytosquelette d'actine de cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ensemencées 4 heures au préalable sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture. De plus, puisque l'inhibition des kinases p38 par le SB203580 peut avoir des effets stimulants sur les kinases Erk1/Erk2 (Harnois et al., 2004), nous avons également inhibé l'activité des MAPK MEK et p38 simultanément. L'efficacité de chacun de ces inhibiteurs pharmacologiques chez les cellules HIEC a préalablement été démontrée en absence de sérum (Bouchard et al., 2008; Harnois et al., 2004). Premièrement, comparativement aux cellules non traitées servant de contrôle (Figure 29A), l'élaboration de réseaux bien développés de fibres de stress parallèles dans la région centrale des cellules HIEC siCNS est stimulée lors l'inhibition des kinases MEK (Figure 29C) et des kinases p38 (Figure 29E), ainsi que lors de l'inhibition combinée de ces deux familles de MAPK (Figure 29G). Il semble donc que les kinases MEK et p38 contribuent à inhiber le développement des fibres de stress ventrales lors du processus d'étalement des cellules HIEC. Puis, alors que l'inhibition des kinases PI3-K chez les cellules HIEC siCNS altère les caractéristiques et l'organisation des fibres de stress (Figure 29I vs 29A), l'inhibition de Src et des SFK avec l'inhibiteur PP2 chez ces mêmes cellules bloque complètement l'élaboration des fibres de stress ventrales (Figure 29K vs 29A). Les cellules dans cette condition présentant plutôt généralement des accumulations arrondies d'actines corticales. Ces résultats indiquent d'une part que chez les cellules HIEC les fonctions des PI3-K sont impliquées pour l'intégrité des caractéristiques du réseau de fibres de stress, mais ne sont pas requises dans le développement des structures de type fibres de stress en général. De plus, en accord avec la littérature (Salsmann et al., 2006), ils confirment le rôle central que joue Src et/ou d'autres membres des SFK en amont des événements régulant la signalisation procontractile impliquée dans le développement des fibres de stress ventrales chez ce modèle cellulaire.

Figure 29 : L'organisation contractile du cytosquelette d'actine des cellules HIEC dépend de l'expression de l'ILK et de l'activité des SFK et est régulée par les kinases PI3-K, MEK et p38

(A-L) Photos d'épifluorescence de l'organisation du réseau d'actine (visualisée en microscopie avec la phalloïdine-TRITC) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 4 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées pendant les 18 heures suivantes soit sans traitement ou soit en présence, de 20  $\mu$ M de PD98059 dans le but d'inhiber les kinases MEK, de 20  $\mu$ M de SB203580 afin d'inhiber les kinases p38, de la combinaison de 20  $\mu$ M de PD98059 et de 20  $\mu$ M de SB203580, puis de 30  $\mu$ M de LY294002 afin d'inhiber les kinases PI3-K ou finalement de 20 $\mu$ M de PP2 pour inhiber les SFK. (C, E et G) Les flèches rouges pointent des exemples de réseaux bien développés de fibres de stress ventrales parallèles chez les cellules HIEC siCNS lors de l'inhibition isolée des kinases MEK (en C) et p38 (en E), ainsi que lors de l'inhibition combinée de ces deux classes de kinases (en G). Barre d'échelle : (A-L) en A : 40  $\mu$ m.



**Figure 29**

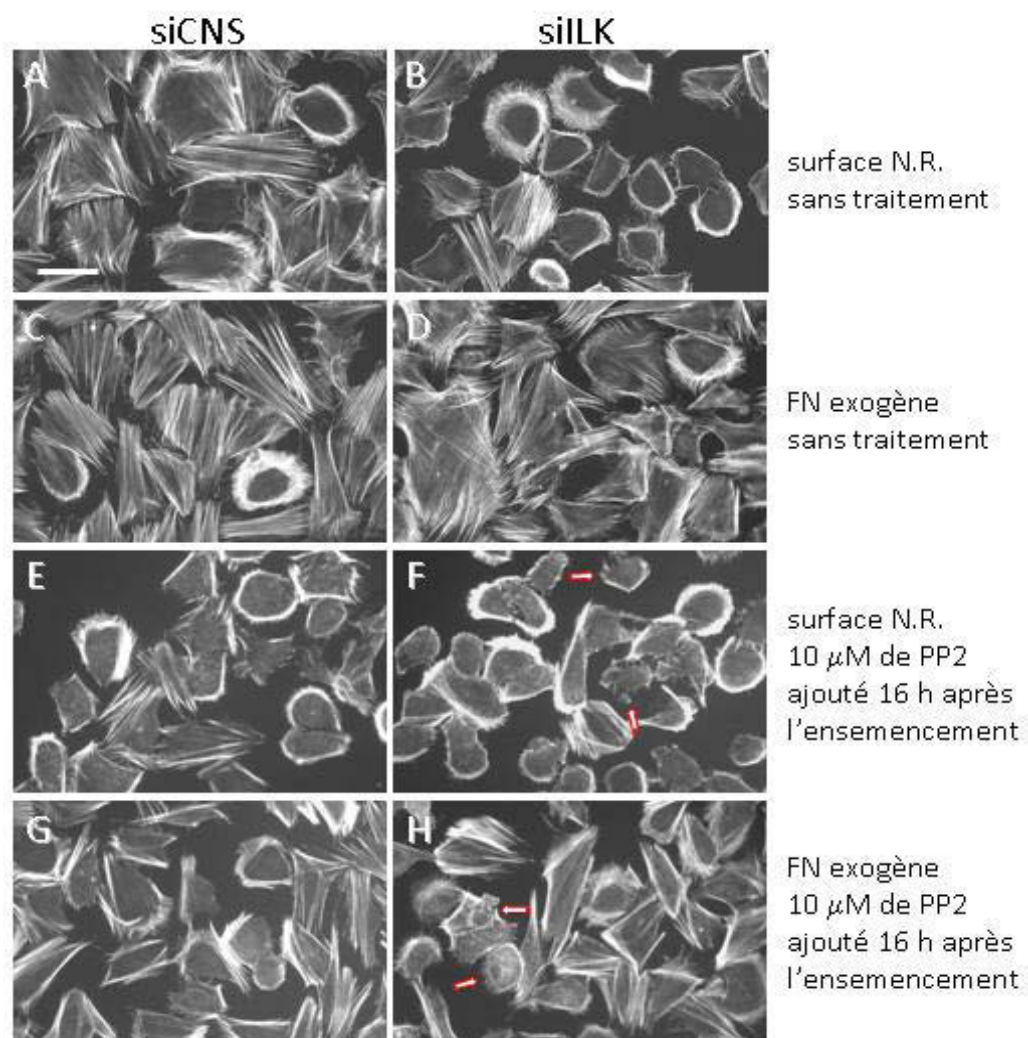
D'autre part, l'inhibition isolée ou combinée des MAPK MEK et p38 induit de légères modifications de l'organisation du cytosquelette d'actine chez les cellules HIEC siILK (Figures 29D, 29F et 29H) comparativement aux cellules HIEC siILK non traitées (Figure 29B). Toutefois, les effets stimulants de l'inhibition de ces kinases sur la formation des fibres de stress sont de façon générale beaucoup moins marqués que chez les cellules HIEC siCNS traitées avec les mêmes inhibiteurs et ne permettent pas de rétablir la morphologie polarisée de type fibroblastique chez les cellules HIEC siILK. Ces résultats indiquent que l'expression de l'ILK est facultative afin que les kinases MEK et p38 puissent moduler l'organisation du cytosquelette d'actine chez les cellules HIEC, mais que cette expression est requise afin que l'inhibition de ces kinases produise leur effet procontractile. Ensuite, l'inhibition des PI3-K chez les cellules HIEC siILK promouvoit l'assemblage de réseaux d'actine de type orthogonal, sans toutefois permettre de rétablir la formation des fibres de stress ventrales (Figure 29J). Cela indique donc que chez les cellules HIEC l'expression de l'ILK est nécessaire afin que l'activité des PI3-K contribue à l'intégrité du réseau de fibres de stress ventrales parallèles. Puis, l'inhibition des SFK chez les cellules HIEC siILK induit généralement la formation de faisceaux arrondie d'actine corticale (Figure 29K). Dans ce cas, bien que nous dénotons que l'actine-F périphérique semble souvent plus affectée chez les cellules HIEC siILK comparativement aux cellules HIEC siCNS dans les mêmes conditions, les effets de l'inhibiteur PP2 induisent une organisation de l'actine généralement analogue chez ces cellules (Figure 29L vs 29K). Ces observations suggèrent que Src et/ou d'autres membres des SFK contrôlent des événements signalétiques en amont du rôle que joue l'ILK dans le développement des caractéristiques contractiles de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC. Toutefois, dans l'ensemble les effets de l'inhibition des membres des SFK et des PI3-K chez les cellules HIEC siCNS et siILK ne nous permettent pas de déterminer si ces kinases contribuent à la formation des fibres de stress ventrales parallèles en régulant les fonctions de l'ILK.

Dans la même optique, il est connu que les fonctions de Src qui sont activées par l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  sont importantes pour la stimulation efficace de RhoA (Huvneers and Danen, 2009; Morgan et al., 2009; Salsmann et al., 2006). Il a également été montré que l'activation des kinases Src et PI3-K sont nécessaires afin de stimuler les premières étapes de la fibrillogénèse la fibronectine (Volberg et al., 2001; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2002). Nous avons donc comparé les effets de l'inhibition des SFK sur l'organisation du cytosquelette d'actine

des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées 16 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (surface N.R.) ou  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène, puis traitées pendant les 24 heures suivantes avec  $10\mu\text{M}$  de PP2. D'abord, les images de microscopie montrent qu'une portion des cellules HIEC siCNS traitées avec le PP2 qui ont été précultivées sur une surface N.R. (Figure 30E) et sur la fibronectine exogène (Figure 30G) présentent des caractéristiques contractiles du cytosquelette d'actine. Ces caractéristiques et l'étalement de ces cellules demeurent cependant généralement moins développés que chez les cellules HIEC siCNS cultivées sans l'inhibiteur PP2 (Figures 30E et 30G vs 30A et 30C). Pour leur part, les cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène et traitées avec l'inhibiteur PP2 présentent un rétablissement relatif des fibres de stress ventrales et de l'organisation contractile de l'actine comparativement aux cellules HIEC siILK sur une surface N.R. qui ont été traitées ou laissées sans traitement (Figures 30H vs 30F et 30B). Ce rétablissement demeure toutefois partiel comparativement aux cellules HIEC siILK cultivées sans traitement sur la fibronectine exogène (Figures 30H vs 30D). D'autre part, l'inhibition des SFK chez les cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène induit une organisation de l'actine globalement analogue de celles observées chez les populations de cellules HIEC siCNS traitées par le PP2 (Figure 30H vs 30E et 30G). Cependant, contrairement à ces dernières, une portion des cellules HIEC siILK traitées sur une surface N.R. ou sur la fibronectine exogène présentent une organisation aberrante et/ou irrégulière de l'actine corticale et de la membrane plasmique périphérique (Figures 30F vs 30E et 30H vs 30G). Cela suggère donc que chez les cellules HIEC, Src et/ou d'autres membres des SFK coopèrent avec l'ILK afin de réguler l'organisation fine des structures sous-membranaires de l'axe MEC-intégrine-actine. Dans l'ensemble, ces résultats proposent que ce soit la matrice de fibronectine assemblée par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK précultivées sur la fibronectine exogène, et d'autre part la matrice de fibronectine endogène soluble assemblée par les cellules HIEC siCNS précultivées sur une surface N.R., qui supportent la formation des fibres de stress et les caractéristiques contractiles intermédiaires de ces cellules lorsque les fonctions des SFK sont inhibées par le PP2 dans ces conditions. Ainsi, il semble que les fonctions de Src dans la fibrillogénèse de la fibronectine pourraient être impliquées dans la formation des fibres de stress ventrales chez les cellules HIEC, mais que d'autres fonctions des SFK — p. ex. la stimulation de l'activité de PI3-K et/ou inhibition de l'activité des kinases MEK et p38 — sont

Figure 30 : La fibronectine et les fonctions des SFK stimulent le développement des fibres de stress ventrales et du phénotype contractile indépendamment de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC

(A-H) Photos d'épifluorescence de l'organisation du réseau d'actine (visualisée en microscopie avec la phalloïdine-TRITC) lors d'une expérience durant laquelle les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK ont été cultivées pendant 16 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (N.R.) ou avec 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN), puis cultivées pendant les 24 heures suivantes soit sans traitement ou soit en présence de 10  $\mu\text{M}$  de PP2 afin d'inhiber les membres des SFK. Les flèches en F et H pointent des cellules HIEC siILK traitées avec le PP2 présentant une organisation aberrante de l'actine corticale et de la membrane plasmique périphérique. Barre d'échelle : (A-H) en A : 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 30**

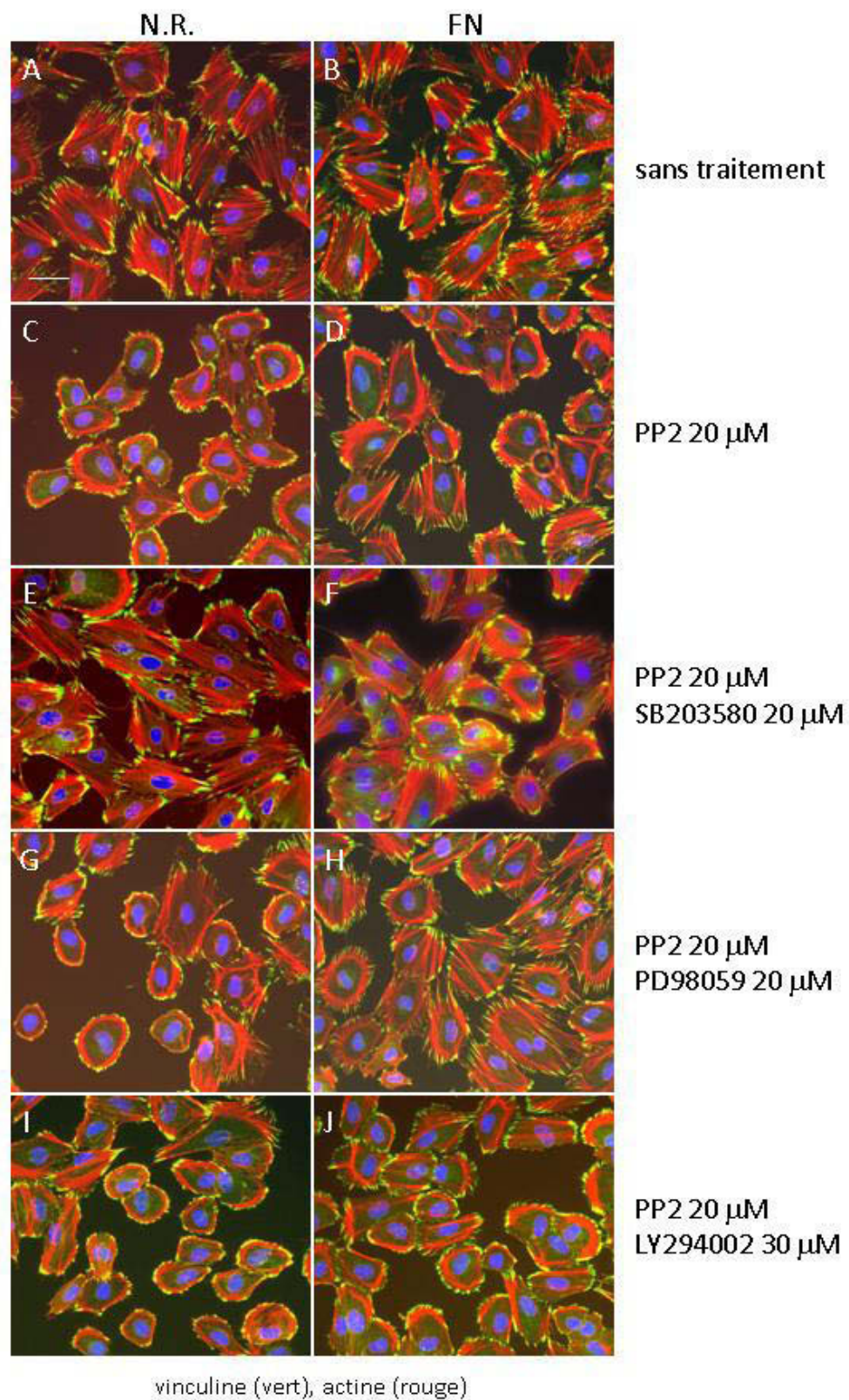
requis pour le développement optimal et/ou le maintien d'un réseau élaboré de fibres de stress ventrales parallèles chez ces cellules. Ces expériences ne permettent toutefois pas de déterminer si les fonctions de Src sont importantes dans la régulation du rôle de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine.

Le rôle de Src dans la régulation directe et/ou indirecte des membres des kinases PI3-K, MEK et p38 a déjà été démontré dans le contexte de l'anoïkose chez les cellules HIEC (Bouchard et al., 2008), ainsi que dans d'autres contextes et types cellulaires (Huvneers and Danen, 2009; Parsons et al., 2010; Schwartz, 2004). Nous avons donc exploré le rôle des SFK dans le contrôle des fonctions des kinases PI3-K, MEK et p38 impliquées dans la régulation de l'axe MEC-intégrine-actine des cellules HIEC. Pour ces expériences, des cellules HIEC natives étaient cultivées pendant 8 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (surface N.R.) ou avec  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène, puis les cellules étaient cultivées lors des 16 à 18 heures suivantes en présence de  $20\mu\text{M}$  de PP2 uniquement ou de la combinaison du PP2 et des autres inhibiteurs pharmacologiques ( $20\mu\text{M}$  de PD98059,  $20\mu\text{M}$  de SB203580,  $30\mu\text{M}$  de LY294002). Les FAs (visualisé par la détection de la vinculine) et le réseau d'actine (visualisé avec la phalloïdine-TRITC) étaient ensuite détectés par immunofluorescence. Premièrement, les images de microscopie montrent que les effets de l'inhibition isolée des SFK chez les cellules HIEC initialement ensemencées sur une surface N.R. (Figure 31C) et sur la fibronectine exogène (Figure 31D) reproduisent de façon générale les effets de l'inhibition des SFK sur le cytosquelette d'actine des cellules HIEC siCNS dans des conditions analogues (voir les figures 29 et 30). Cependant, il est à noter que l'étalement et l'organisation du cytosquelette d'actine de ces cellules semblent généralement moins développés que chez les cellules HIEC des figures 30E et 30G, et ce, vraisemblablement en raison des quantités inférieures de fibronectine assemblée durant le temps plus court de précultures (8 h vs 16 h) avant l'ajout des inhibiteurs. Puis, sur une surface N.R., l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC ayant subi l'inhibition concomitante des SFK et des kinases MEK se rapproche de celle typiquement présentée par celles uniquement traitées avec le PP2 (Figure 31G vs 31C). Or, le même traitement (PP2 + PD98059) chez les cellules HIEC sur la fibronectine exogène permet de rétablir le phénotype contractile de ces cellules à un niveau comparable de celui des cellules HIEC non traitées (Figure 31H vs 31B). Qui plus est, le phénomène inverse est observé lors de



Figure 31 : La fibronectine contribue à la régulation des kinases responsables de contrôler l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC

(A-J) Photos d'immunofluorescence représentatives des FAs (visualisés par la détection de la vinculine en vert) et de l'organisation du cytosquelette d'actine (visualisée en épifluorescence avec la phalloïdine-TRITC en rouge) chez des cellules HIEC natives. Ces cellules étaient cultivées pendant 8 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture (N.R.) ou avec  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN), puis cultivées pendant les 16 heures suivantes sans traitement (en A et B) ou en présence de  $20 \mu\text{M}$  de PP2 uniquement pour inhiber les SFK (en C et D) ou soit en présence de  $20 \mu\text{M}$  de PP2 combinés à soit  $20 \mu\text{M}$  de SB203580 (en E et F), soit  $20 \mu\text{M}$  de PD98059 (en G et H) , ou soit  $30 \mu\text{M}$  de LY294002 (en I et J) afin d'inhiber respectivement les kinases p38, MEK et PI3-K simultanément aux SFK. (E-H) Les images suggèrent que sur une surface N.R. l'action des SFK neutraliserait les fonctions des p38 empêchant le développement des structures matures de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC et que sur la fibronectine exogène elle régulerait négativement les fonctions anticontractiles des kinases MEK. (I et J) Ces images suggèrent que l'activation des membres des SFK est facultative afin que la fibronectine puisse exciter les fonctions des PI3-K favorisant le développement des fibres de stress ventrales. Barre d'échelle : (A-J) en A :  $40 \mu\text{m}$ .



**Figure 31**

l'inhibition concomitante des SFK et des kinases p38, c'est-à-dire un rétablissement plus efficace des structures de l'axe intégrine-actine associées au phénotype contractile chez les cellules HIEC sur une surface N.R. (Figures 31E vs 31C et 31A), mais non chez les cellules HIEC sur la fibronectine exogène (Figures 31F vs 31D et 31B). Ces observations suggèrent fortement que le substrat d'adhésion des cellules HIEC (N.R. vs FN) régule de façon opposée l'implication des kinases MEK et p38 dans la régulation de l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC. Par ailleurs, la plupart des cellules HIEC sur une surface N.R. soumise à l'inhibition simultanée des SFK et des PI3-K présentent une organisation de l'axe intégrine-actine comparable de celle qui est observée chez les cellules HIEC traitées par le PP2 uniquement (Figure 31I vs 31C). Or, le même traitement (PP2 + LY294002) chez les cellules sur la fibronectine exogène produits des effets bloquants plus prononcés sur la formation des fibres de stress ventrales que chez les cellules HIEC traitées par le PP2 uniquement (Figure 31I vs 31D). Cette observation propose que les fonctions des kinases PI3-K soient importantes afin de médier les effets procontractiles de la fibronectine. Dans l'ensemble, ces derniers résultats avec les inhibiteurs confirment les positions clés qu'occupent les membres des SFK (en amont) et des kinases PI3-K, MEK et p38 dans la signalisation de type *outside-in* contrôlant l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC, de même que l'influence importante de la composition en fibronectine de la MEC sur cette signalisation.

#### 3.3.4 *Les fonctions de l'ILK sont facultatives afin que la fibronectine, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la tensine localisent dans les sites d'initiation de l'assemblage de la fibronectine*

Nous avons effectué différentes expériences afin de mieux documenter le rôle spécifique de l'ILK et du complexe PIP dans les mécanismes responsables de la fibrillogénèse de la fibronectine chez les CEIs. D'abord, nous avons précédemment démontré que l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC (siILK) enraye la fibrillogénèse de la forme soluble de la fibronectine endogène et que l'adhésion des cellules HIEC à un substrat de fibronectine plasmatique exogène permet d'outrepasser le rôle normalement essentiel de l'ILK dans le processus de fibrillogénèse. Or, d'une part la composition modulaire de la fibronectine plasmatique et de la fibronectine cellulaire est différente et d'autre part, il est connu que la régulation de la composition de la fibronectine cellulaire par épissage alternatif peut faire varier

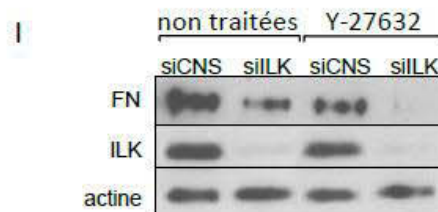
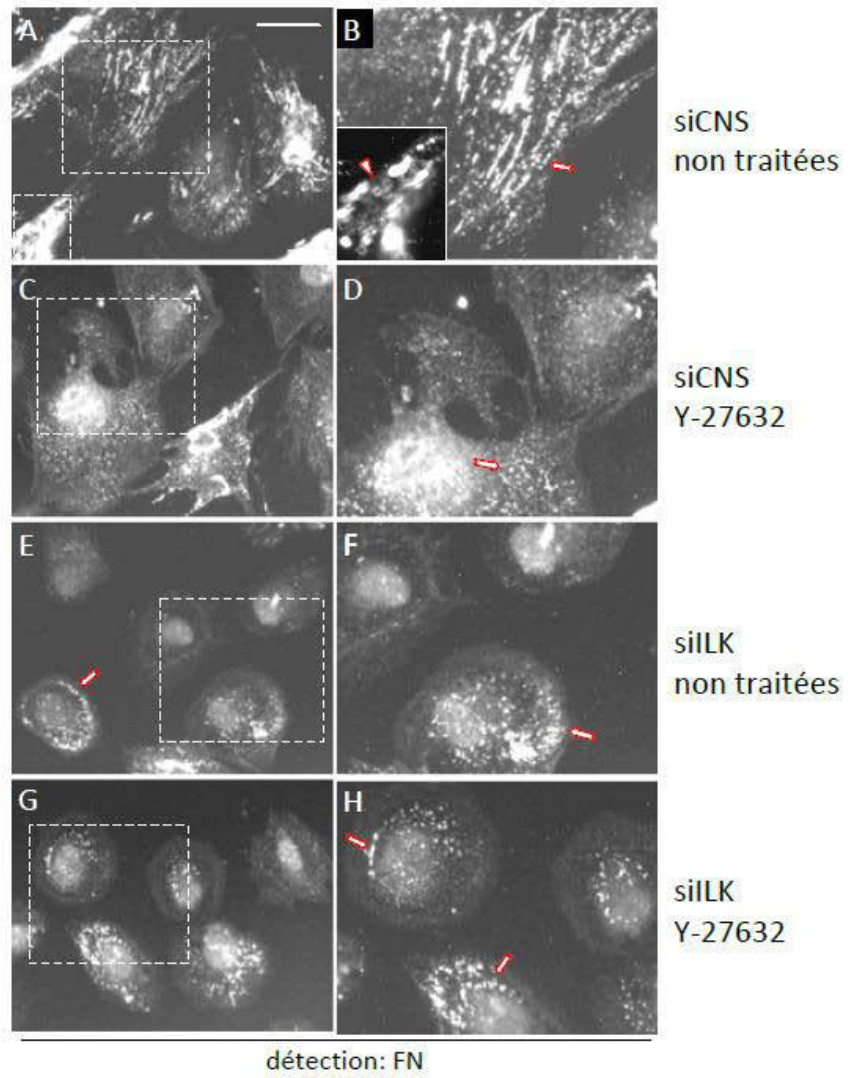
ses propriétés et ainsi moduler les interactions qui sont responsables de son assemblage (Cseh et al., 2010; Schwarzbauer and DeSimone, 2011). Nous avons donc vérifié si des distinctions dans la composition modulaire de la fibronectine cellulaire exprimée par les cellules HIEC pourraient expliquer pourquoi les cellules HIEC siILK peuvent assembler la fibronectine plasmatique exogène, mais non la fibronectine endogène qu'elles expriment. Toutefois, une analyse préliminaire en RT-PCR montre que l'expression des trois principaux modules de la fibronectine susceptibles d'être régulés par épissage alternatif (EIIIA, EIIIB et la région variable V) (Schwarzbauer and DeSimone, 2011) diminue comparativement aux cellules HIEC siCNS, mais est maintenue chez les cellules HIEC siILK en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK (données non présentées). Ces résultats s'accordent avec la diminution de l'expression de la fibronectine que nous avons précédemment décrite en PCR quantitative (voir la figure 15A) chez les cellules HIEC siILK. De plus, ils tendent à démontrer que la capacité intrinsèque de la fibronectine endogène à être assemblée dans la MEC n'est pas altérée chez les cellules HIEC siILK. En ce sens, tel que nous l'avons précédemment mentionné, nous avons observé que la fibronectine plasmatique exogène ajoutée au milieu ne permet pas de secourir le phénotype contractile de cellules HIEC siILK préadhérées sur une surface N.R. Ces données appuient ensemble que ce soit la capacité des cellules HIEC à utiliser les homodimères compacts et solubles de fibronectine dans le processus de fibrillogénèse qui est spécifiquement entravée lors de l'inhibition de l'expression de l'ILK.

Il est généralement reconnu que les interactions entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine entraînent l'ouverture mécanodépendante des homodimères compacts et solubles de la fibronectine, ce qui permet la présentation des sites d'interactions cryptiques d'autoassemblage de cette protéine. Ensuite, l'assemblage de la fibronectine fibrillaire induit une boucle de rétroactions positives permettant le développement coordonné de la rigidité de la MEC et de la tension isométrique RhoA-dépendante le long de l'axe MEC-intégrine-actine (Geiger et al., 2009; Huvneers et al., 2008; Scott et al., 2015; Wang et al., 2005; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). Ainsi, afin de mieux cibler l'étape où l'inhibition de l'expression de l'ILK bloque la fibrillogénèse de la fibronectine soluble chez les cellules HIEC, nous avons comparé par immunofluorescence les effets de l'inhibition de l'ILK et de ROCK sur l'organisation de la fibronectine détectée par l'anticorps HFN 7.1 chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. Rappelons que l'anticorps HFN 7.1 reconnaît un site cryptique entre les domaines FNIII<sub>9</sub> et

FNIII<sub>10</sub> de la fibronectine et donc cible en principe principalement le bassin de fibronectine fibrillaire et/ou préfibrillaire associé aux intégrines à la surface des cellules (Baneyx et al., 2001; Garcia et al., 1999). Pour ces expériences, les cellules étaient initialement ensemencées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées pendant 24 heures en absence (non traitées) ou en présence de 20  $\mu$ M de Y-27632. D'abord, l'anticorps HFN 7.1 détecte une multitude de petits agrégats assemblés en longues structures linéaires perlées typiques des fibrilles et des fibres de fibronectine fibrillaire péricellulaire chez les cellules HIEC siCNS non traitées (Figures 32A et 32B). De plus, des structures bulbotubulaires de fibronectines sont parfois détectées le long des structures fibrillaires de certaines de ces cellules (Figure 32B; zone encadrée). Dans ce dernier cas, il pourrait s'agir de la fibronectine internalisée avec les intégrines par les caveolae (Shi and Sottile, 2008; Valdembrì et al., 2011). Bien que des accumulations plus importantes de fibronectine soient parfois détectées chez les cellules HIEC siCNS traitées avec le Y-27632, de façon générale les agrégats de fibronectine de ces cellules semblent désorganisés, dispersés et visuellement plus ténus que chez les cellules HIEC siCNS servants de contrôle (Figure 32D vs 32B). D'ailleurs, l'analyse par immunobuvardage des quantités de fibronectine dans la MEC isolée des cellules HIEC siCNS traitées ou non avec le Y-27632 confirme la diminution marquée de la fibronectine déposée dans la MEC de ces cellules lorsque ROCK est inhibée (Figure 32I, siCNS : Y-27632 vs non traitées). Ces données indiquent donc que chez les cellules HIEC l'activité de ROCK n'est pas essentielle dans la formation des agrégats de fibronectine préfibrillaire, mais permet leur assemblage en fibrilles à la surface de ces cellules. D'autre part, tel que nous l'avons précédemment montré (voir la figure 15), moins de fibronectine est détectée en immunofluorescence par l'anticorps HFN 7.1 chez les cellules HIEC siILK non traitées comparativement aux cellules HIEC siCNS servants de contrôle (Figure 32E vs 32A). Les images à plus fort grossissement révèlent que l'inhibition de l'expression de l'ILK n'empêche pas la formation d'agrégats de fibronectine préfibrillaire chez les cellules HIEC siILK traitées ou non avec le Y-27632 (Figure 32F vs 32H). D'ailleurs, l'inhibition de ROCK chez les cellules HIEC siILK ne semble pas avoir d'effet apparent sur l'organisation de la fibronectine comparativement aux cellules HIEC siILK non traitées (Figure 32E vs 32G), ce qui s'accorde avec le fait que l'activité de la voie RhoA/ROCK est partiellement inhibée chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. De plus, contrairement aux agrégats

Figure 32 : L'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC entrave la fibrillogénèse de la fibronectine par des effets distincts de ceux de l'inhibition de ROCK

(A-H) Photos d'immunofluorescence représentatives de la fibronectine ciblée par l'anticorps HFN 7.1 chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK initialement ensemencées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis cultivées pendant 24 heures en absence (non traitées) ou en présence de 20  $\mu$ M de Y-27632 afin d'inhiber ROCK. Alors que les cellules HIEC siCNS non traitées rassemblent plusieurs agrégats de fibronectine assemblée en structures fibrillaires perlées (ex. pointé par la flèche en B) et présentent parfois des structures bulbotubulaires de fibronectine à proximité des sites d'adhésion cellule-MEC (ex. pointé par la tête de flèches en B), chez les cellules HIEC siCNS traitées avec le Y-27632 les agrégats de fibronectine demeurent généralement dispersés (ex. pointé par la flèche en D). L'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC siILK ne bloque pas entièrement la formation d'agrégats de fibronectine à la surface des cellules et ceux-ci se concentrent habituellement dans la région cellulaire formant l'interface entre la périphérie du corps cellulaire et la lame intérieure de la membrane plasmique des cellules HIEC siILK non traitées (ex. pointés par les flèches en E et F), de même que chez les cellules HIEC siILK traitées avec le Y-27632 (ex. pointés par les flèches en H). Barre d'échelle : (A,C,E et F) en A : 30  $\mu$ m. (I) Immunobuvardages représentatifs de la fibronectine détectée dans la MEC (MEC sans les cellules, isolée avec 27  $\mu$ M d'hydroxyde d'ammonium) déposée par les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 48 heures en absence (non traitées) ou en présence de 20  $\mu$ M de Y-27632. Les niveaux de l'ILK, de même que de la  $\beta$ -actine (utilisés comme contrôle de normalisation protéique) ont également été vérifiés dans les fractions cellulaires isolées correspondantes.



**Figure 32**

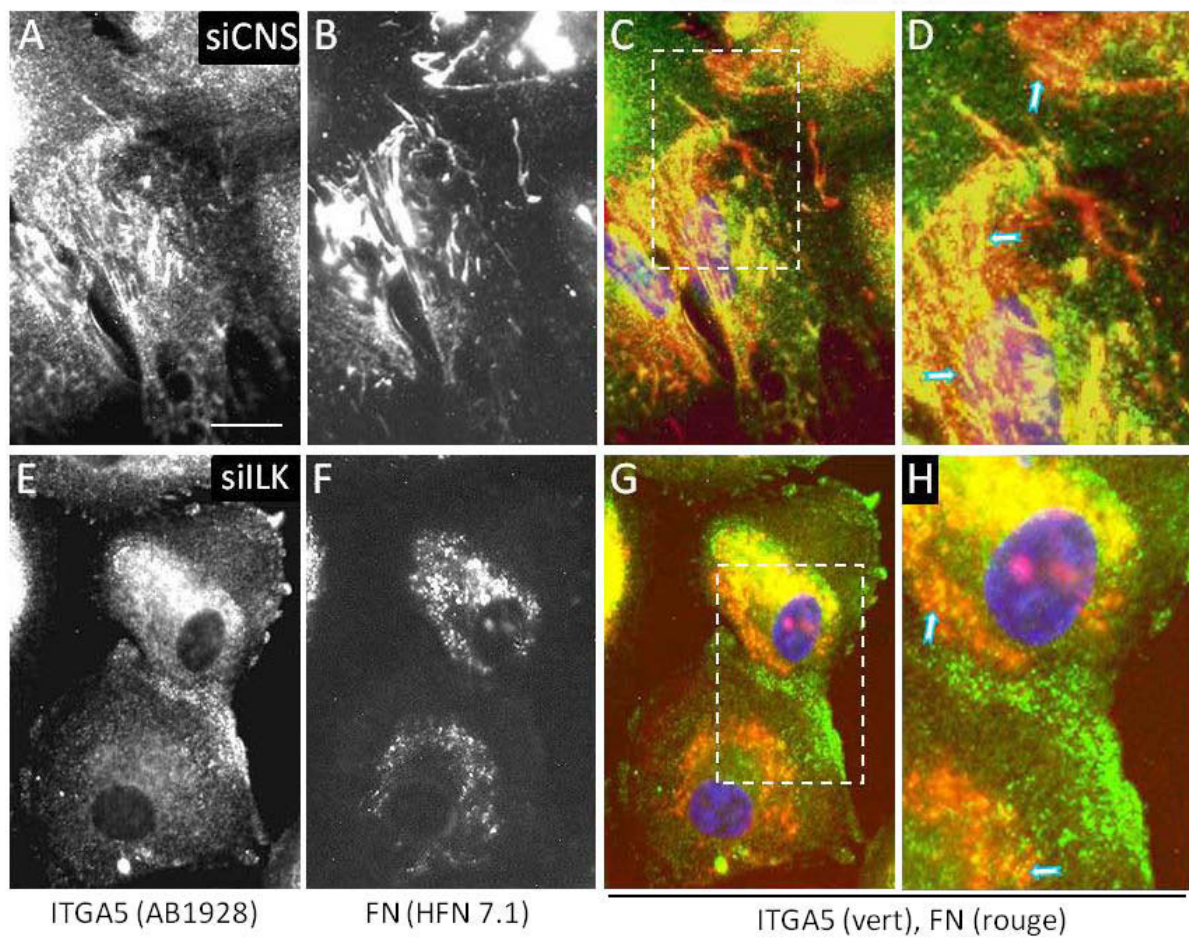
détectés chez les cellules HIEC siCNS traitées par le Y-27632 (Figure 32D), les agrégats détectés chez les cellules HIEC siILK se concentrent habituellement au sein de courtes structures perlées perpendiculaires à la membrane plasmique et/ou dans la région ceinturant la lame interne des lamellipodes et le corps cellulaire (Figures 32F et 32H). Or, de manière intéressante cette région correspond à la région où est normalement initiée la fibrillogénèse de la fibronectine chez les cellules adhérentes en culture 2D (Baneyx et al., 2001; Boettiger and Wehrle-Haller, 2010; Pankov et al., 2000; Tomasini-Johansson et al., 2006). Par ailleurs, les analyses par immunobuvardage de la MEC déposée par ces cellules suggèrent un effet additif de l'inhibition simultanée de l'expression de l'ILK et de l'activité de ROCK sur la capacité des cellules à déposer la fibronectine dans la MEC (Figure 32I siILK : non traitées vs Y-27632). Cependant, nous avons démontré précédemment qu'une portion mineure de la population des cellules HIEC siILK exprime toujours des niveaux relativement élevés de l'ILK. Il est donc raisonnable d'assumer que cet effet additif serait causé par l'impact négatif de l'inhibition de ROCK sur la fibrillogénèse chez les cellules HIEC siILK dont la diminution de l'expression de l'ILK par le siILK est moins efficace. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les fonctions de RhoA et l'expression de l'ILK sont facultatives dans la formation des agrégats de fibronectine préfibrillaire à la surface des cellules HIEC. Puis, que l'inhibition de l'expression de l'ILK n'empêche pas la formation et l'accumulation de ces agrégats dans les régions des cellules où débute normalement l'assemblage de la fibronectine en matrice fibrillaire péricellulaire. Ces résultats s'accordent de plus avec l'hypothèse que chez les cellules HIEC l'implication de l'ILK dans le processus de fibrillogénèse précède celle de la stimulation mécanodépendante de la voie RhoA/ROCK pour ce même processus.

Nous avons précédemment établi que le niveau d'expression de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  n'est pas modifié par l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC siILK. Dans cette optique, nous avons également comparé la distribution de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  en immunofluorescence chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture. En premier lieu, nous avons utilisé l'anticorps AB1928 (Millipore) qui est dirigé contre la portion C-terminale (cytoplasmique) de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ . D'abord, chez les cellules HIEC siCNS cet anticorps produit un marquage ponctué et perlé s'accumulant le long de structures fibrillaires (Figure 33A).



Figure 33 : Les fonctions de l'ILK dans la fibrillogénèse de la fibronectine sont facultatives pour la colocalisation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de la fibronectine chez les cellules HIEC

(A, B, E et F) Photos d'immunofluorescence représentatives (A et E) du bassin cellulaire total de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (ITGA5) et (B et F) de la fibronectine (FN) codétectées respectivement par l'anticorps AB1928 (Millipore) et par l'anticorps HFN 7.1 chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture. (C et G) Superposition des immunofluorescences précédentes de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (vert) et de la fibronectine (rouge) chez les mêmes cellules HIEC siCNS et HIEC siILK. (D) Agrandissements de la zone encadrée en C montrant les structures fibrillaires perlées de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui colocalisent avec les fibrilles de fibronectine endogène (ex. pointés par les flèches). (H) Agrandissements de la zone encadrée en G montrant la colocalisation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de la fibronectine le long de courts segments rectilignes perlés perpendiculaires à la circonférence des cellules (ex. pointés par les flèches). (C, D, G et H) Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barre d'échelle : (A, B, C, E, F et G) en A : 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 33**

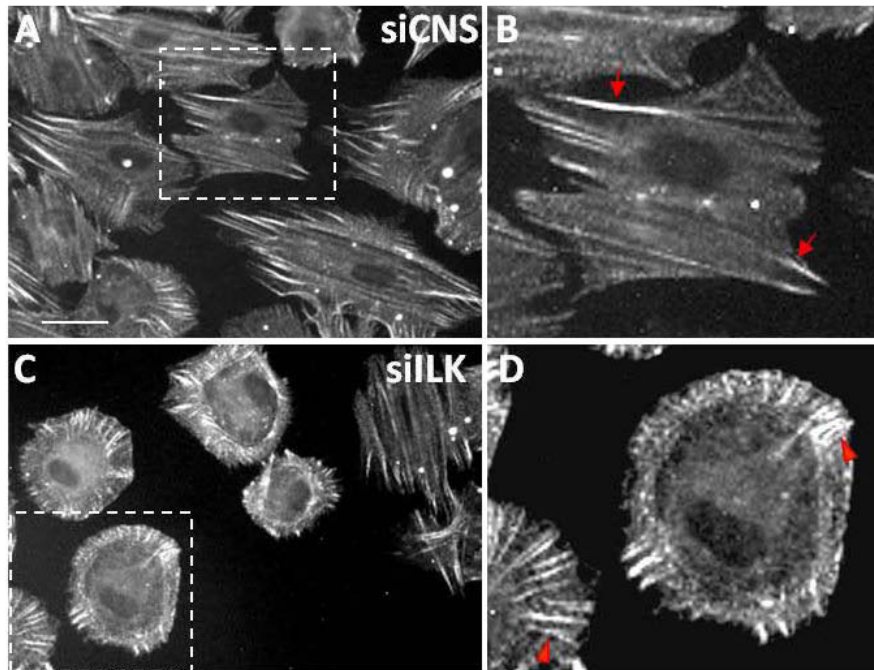
Conformément au rôle de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans les FBs, ce marquage de type fibrillaire de la sous-unité  $\alpha 5$  colocalise avec celui de la fibronectine fibrillaire (extracellulaire) détectée en parallèle avec l'anticorps HFN 7.1 chez les mêmes cellules (Figures 33B et 33C). La détection de la sous-unité  $\alpha 5$  avec l'AB1928 chez les cellules HIEC siILK produit également un marquage ponctué. Cependant les structures perlées sont généralement beaucoup plus courtes et forment rarement des structures fibrillaires comparables à ce qui est observé chez les cellules HIEC siCNS (Figure 33D vs 33A). Chez plusieurs cellules HIEC siILK, le marquage ponctué se concentre plutôt au sein de protrusions et de segments périphériques de la membrane plasmique (Figure 33D), de même qu'au niveau de la région cytoplasmique centrale et périnucléaire où il colocalise de façon plus diffuse avec la fibronectine (Figures 33E). Dans ce dernier cas, il pourrait s'agir de bassins de ces deux protéines associés à des organelles/structures endomembranaires (p. ex. appareil de Golgi, structures des voies endosomales) (Larjava et al., 1990; Laukaitis et al., 2001). De plus, la sous-unité  $\alpha 5$  est également partiellement codétectée avec la fibronectine au sein de courtes formations perlées perpendiculaires à la membrane plasmique et/ou ceinturant la lame interne des lamellipodes des cellules HIEC siILK (Figure 33F). Soit, selon le même type de marquage que celui décrit à la figure précédente concernant les agrégats de fibronectine associée aux cellules HIEC siILK (voir la figure 32F). Ces immunofluorescences avec l'anticorps AB1928 indiquent par conséquent que l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC n'est pas indispensable afin que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine endogène colocalisent dans les régions où débute normalement l'assemblage de la fibronectine fibrillaire, mais est importante afin que ce processus s'exécute.

L'anticorps mAB16 est généralement reconnu comme étant un inhibiteur compétitif de la liaison de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  à ses ligands (Byron et al., 2009). En effet, le domaine de reconnaissance de cet anticorps sur la sous-unité  $\alpha 5$  est situé à proximité du site de liaison à la séquence peptidique RGD de la fibronectine (Burrows et al., 1999). Cela permet en principe à cet anticorps de cibler en immunofluorescence les hétérodimères de l'intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  dont le site de liaison à la séquence RGD est accessible. Soit les sous-populations de cette intégrine ayant une conformation active présentant le site de liaison à la séquence RGD et possiblement dont ce site n'est pas encombré allostériquement par un ligand (Askari et al., 2009; Takagi et al., 2003; Xia and Springer, 2014). Ainsi, des immunofluorescences ont été effectuées avec l'anticorps mAB16 (fourni généreusement par le Dr K. Yamada, NIH) sur des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK

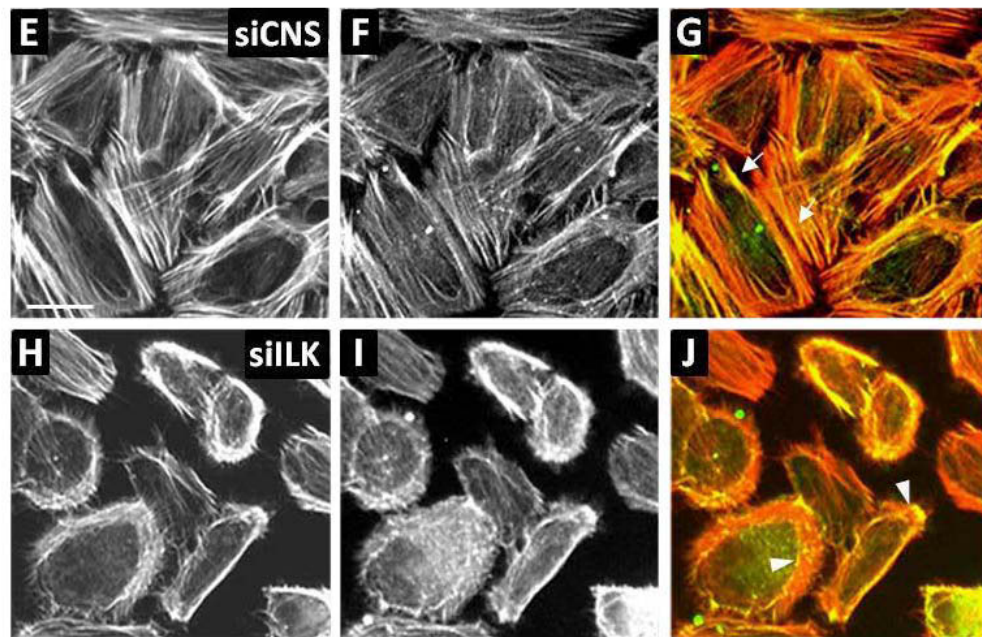
fixées au méthanol (Figures 34A à 34D) et chez des cellules fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 2 %) (Figures 34F et 34I). Précisons dans ce cas que la fixation avec 2 % de PFA qui a été utilisé lors des codétectations de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et du cytosquelette d'actine (visualisée en épifluorescence avec la phalloïdine-TRITC; Figures 34E et 34H) est plus susceptible de préserver les membranes et la conformation native des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  que la fixation au méthanol (Morgan and Huber, 1967). D'abord, conformément à la détection ciblée d'une portion de la population active de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , le signal d'immunofluorescence avec cet anticorps est plus restreint chez les cellules HIEC siCNS (Figure 34A) et HIEC siILK (Figure 34C) comparativement au marquage respectif de cette intégrine par l'anticorps AB1928 chez ces mêmes cellules (voir figures 33A et 33D). Plus précisément, le bassin de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  détectée par l'anticorps mAB16 chez les cellules des deux populations cellulaires expérimentales est majoritairement associé avec le réseau de microfilaments d'actine de ces cellules. C'est-à-dire, principalement avec les fibres de stress ventrales chez les cellules HIEC siCNS (Figures 34B, 34E, 34F et 34G). Puis, avec les faisceaux d'actine corticale et les fibres de stress dorsales et les arcs transverses des réseaux de type orthogonal des cellules HIEC siILK (Figures 34D, 34H, 34I et 34J). Ces observations s'accordent avec le fait que la conformation active des intégrines permet l'échafaudage du lien cytoplasmique avec les microfilaments d'actine du cytosquelette (Askari et al., 2009). Ainsi, ces résultats confirment que l'association entre le domaine cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et le réseau de microfilaments d'actine n'est pas empêchée par l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC (siILK). Les immunofluorescences montrent également que l'anticorps mAB16 reconnaît plus fortement les intégrines se trouvant spécifiquement sur la portion interne de certains FAs matures des cellules HIEC siCNS et sur la section adjacente des fibres de stress ventrales associés à ces structures d'adhésion (Figures 34B et 34G). Or, ces segments de l'axe MEC-intégrine-actine sont également ceux typiquement décrits pour être le lieu de la ségrégation des FBs à partir des FAs matures chez les cellules en culture 2D (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000). Ces résultats suggèrent donc que cette portion des FBs favorise une conformation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  rendant accessible le site de liaison de la séquence RGD de la fibronectine. Chez les cellules HIEC siILK, le mAB16 reconnaît plus intensément la portion interne de certaines fibres de stress dorsales associées aux FAs immatures, ainsi que certains segments des arcs transverses ou de

Figure 34 : L'expression de l'ILK chez les cellules HIEC n'est pas essentielle afin que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  présente le site de liaison à la séquence RGD de la fibronectine

(A, C, F et I) Photos d'immunofluorescence représentatives de la détection de la sous-unité  $\alpha 5$  (ITGA5) de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  avec l'anticorps mAB16 (fourni par le Dr K. Yamada, NIH) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture, puis fixées avec du méthanol (en A et C) ou une solution 2 % paraformaldéhyde (en F et I). Cet anticorps cible en principe le bassin de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dont le site de liaison à la séquence RGD est accessible. (B et D) Agrandissement des zones encadrées chez les cellules HIEC siCNS en A et chez les cellules HIEC siILK en C. (G et J) Superposition des images de la détection de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  par l'anticorps mAB16 (en F et I) et du cytosquelette d'actine (visualisé avec la phalloïdine-TRITC; en E et H) chez les mêmes cellules. Les images démontrent clairement que la sous-population de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  reconnue par l'anticorps mAB16 est codistribuée avec les structures de l'axe intégrine-actine chez les cellules des deux populations expérimentales. De plus, chez les cellules HIEC siCNS cet anticorps reconnaît plus fortement les intégrines se trouvant spécifiquement sur le segment de cet axe où les FBs se forment à partir des FAs matures (ex. pointés par les flèches en B et G). Chez les cellules HIEC siILK, c'est plutôt la portion interne de certaines fibres de stress dorsales associées aux FAs et différents segments des arcs transverses qui sont le plus intensément marqués (ex. pointés par les têtes de flèche en D et J). Cette région de l'axe intégrine-actine correspond à la région où est normalement initié l'assemblage de la fibronectine. Barre d'échelle : (A et B) en A et (E-J) en E : 50  $\mu\text{m}$ .



détection: ITGA5 (mAb 16)



détection: actine

détection: ITGA5 (mAb 16)

ITGA5 (vert), actine (rouge)

**Figure 34**

l'actine corticale (Figures 34D et 34J). Or, ces régions correspondent de nouveau avec celles où les homodimères compacts et solubles de fibronectine sont originellement étirés et assemblés par les intégrines dans les étapes précoces du processus de fibrillogénèse (Baneyx et al., 2001; Tomasini-Johansson et al., 2006). Ces résultats démontrent donc que l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC n'est pas essentielle afin que les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  adoptent une conformation active dont la portion extracellulaire présente le site de liaison à la séquence RGD de la fibronectine.

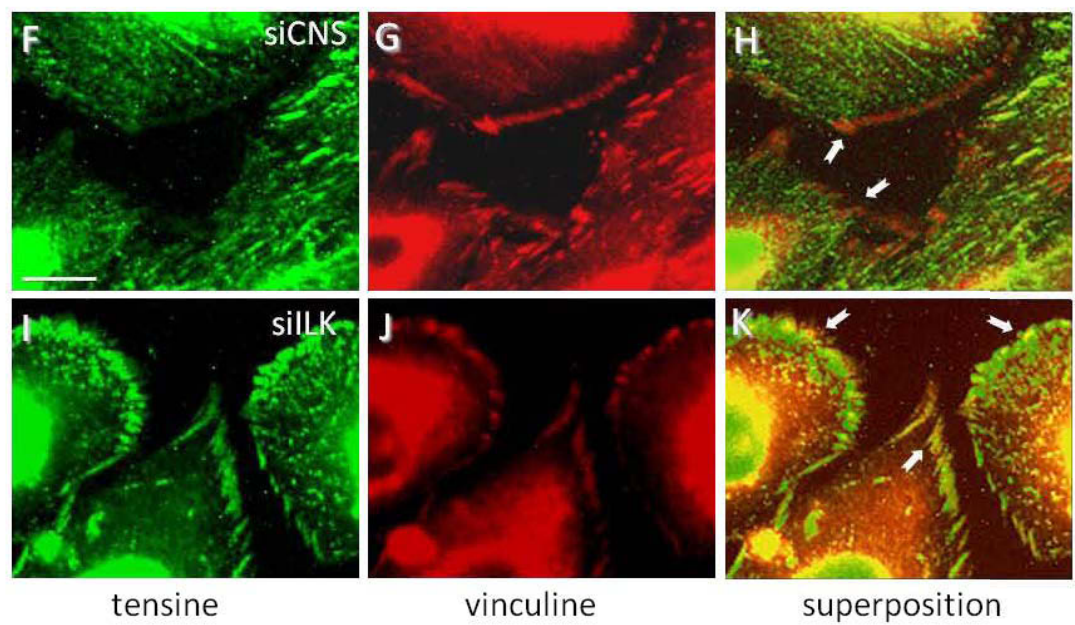
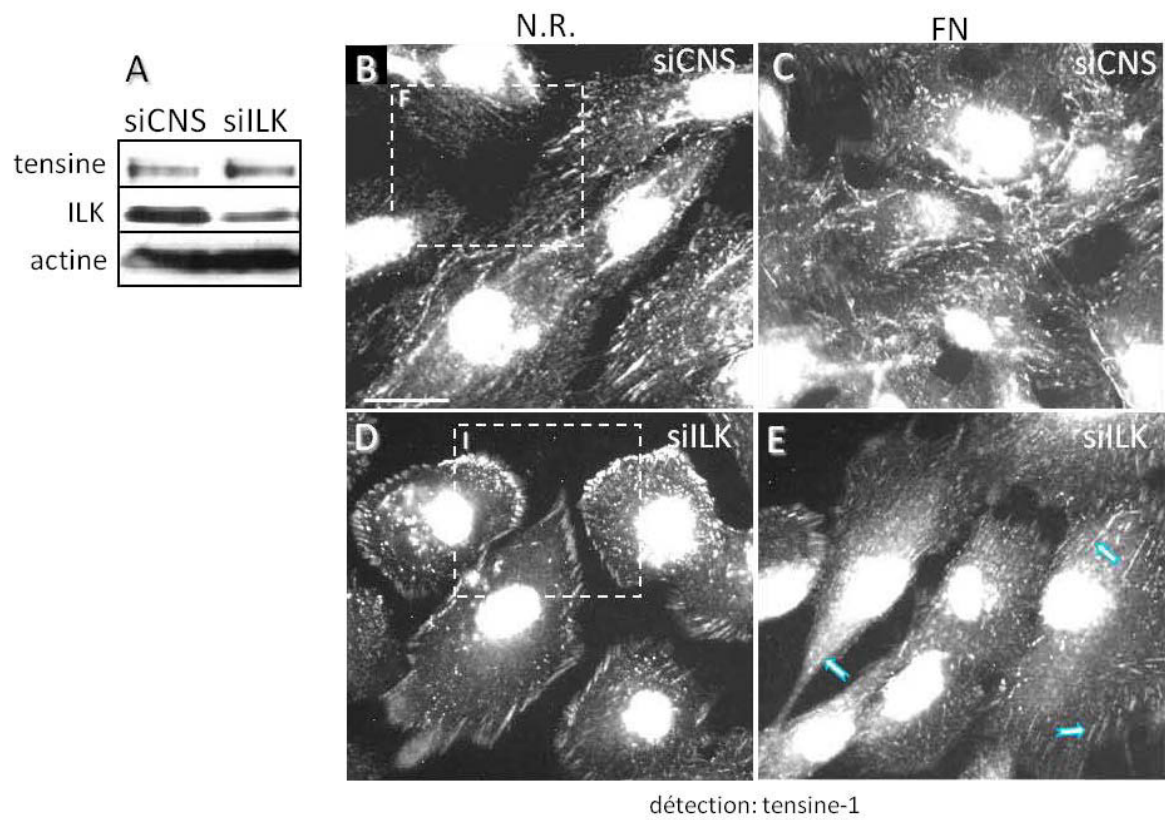
L'ILK et le complexe PIP ont été identifiés pour servir de plateforme dans le recrutement de la tensine — une autre protéine adaptatrice importante des FBs — dans les FAs lors de la formation des FBs chez les cellules fibroblastiques de reins de souris (Stanchi et al., 2009). Nous avons donc comparé la distribution de la tensine en immunofluorescence chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées pendant 24 heures sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu de culture ou avec de la fibronectine exogène. Tout d'abord, des analyses en immunobuvardage ont permis de confirmer que les niveaux protéiques de la tensine sont analogues chez les cellules HIEC siCNS et les cellules HIEC siILK (Figure 35A). Ensuite, un signal intense de la tensine est détecté en immunofluorescence au niveau de la région centrale des cellules HIEC siCNS (Figures 35B et 35C) et des cellules HIEC siILK (Figures 35D et 35E). Toutefois, il est également possible d'observer qu'indépendamment de la condition d'adhésion, la tensine des cellules HIEC siCNS est distribuée selon un marquage fibrillaire typique des FBs (Figures 35B et 35C) (Worth and Parsons, 2010). De plus, bien que la tensine colocalise partiellement à l'occasion avec la vinculine chez ces mêmes cellules, elle est généralement absente des FXs et des FAs détectés grâce à la vinculine en périphérie des cellules (Figures 35G et 35H). Ces observations confirment que chez les cellules HIEC siCNS, l'essentiel du bassin cellulaire de la tensine localise dans les structures fibrillaires formées par les FBs. D'autre part, chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. nous observons sans surprise une forte diminution du marquage fibrillaire de la tensine (Figures 35D et 35I), ainsi qu'une augmentation de la colocalisation de la tensine et de la vinculine au niveau des FXs et de la portion interne des FAs immatures (Figures 35I, 35J et 35K). De plus, l'inhibition de l'expression de l'ILK entraîne l'apparition de nombreux petits agrégats de tensine dispersés au niveau du cytoplasme des cellules HIEC siILK (Figure 35I). Ces agrégats forment parfois de



Figure 35 : Les fonctions de l'ILK chez les cellules HIEC contribuent à l'intégrité des FBs, mais ne sont pas essentielles pour la formation de ce type de structure

(A) Immunobuvardage de l'expression de la tensine chez les cellules HIEC siCNS et siILK. Les niveaux de l'ILK, de même que de la  $\beta$ -actine (contrôle de normalisation protéique) ont également été analysés. (B-E) Photos d'immunofluorescence représentatives de la tensine chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK adhérentes sur des lamelles de verre prétraitées avec du milieu (N.R.) ou avec  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène (FN). Les images indiquent que l'adhésion sur la fibronectine exogène en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK permet de secourir – au moins partiellement – l'élaboration des FBs (ex. pointés par les flèches en E). (F) Agrandissement de la zone F encadrée en B. (G) Immunofluorescence de la vinculine dans la même zone et (H) superposition de ces immunofluorescences de la tensine (vert) et de la vinculine (rouge). La superposition révèle que chez les cellules HIEC siCNS la tensine est principalement distribuée selon un marquage fibrillaire dans les FBs et qu'elle ne colocalise généralement pas avec la vinculine dans les FXs et les FAs de la périphérie des cellules (ex. pointés par les flèches en H). (I) Agrandissement de la zone I encadrée en D. (J) Immunofluorescence de la vinculine dans la même zone et (K) superposition de ces immunofluorescences. La superposition montre qu'en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK, la tensine ne forme pas de marquage fibrillaire et qu'elle est généralement colocalisée avec la vinculine au niveau des FXs et des FAs immatures des cellules HIEC siILK (ex. pointés par les flèches en K). Barre d'échelle : (B-E) en A :  $30 \mu\text{m}$ .





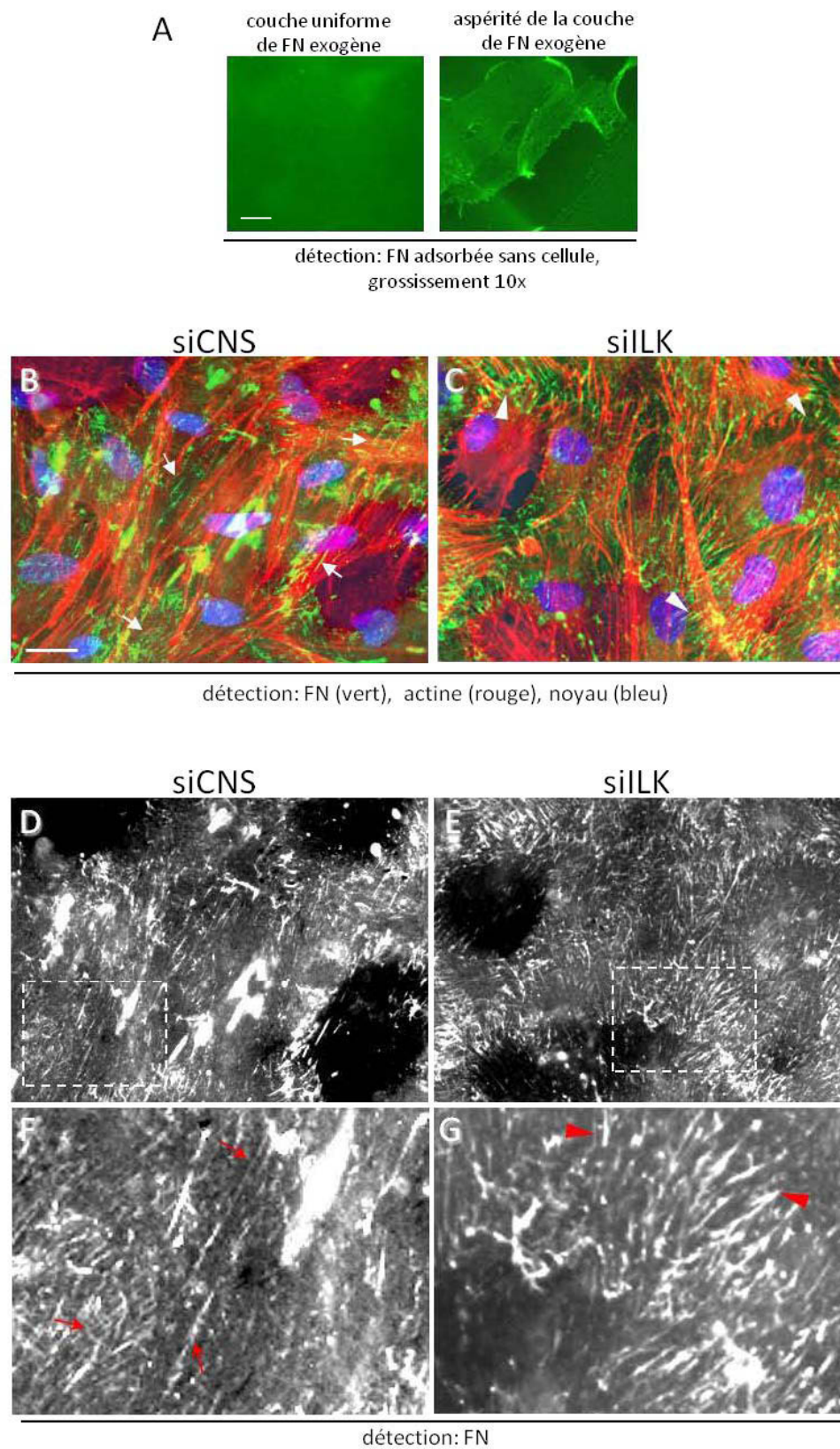
**Figure 35**

courtes structures linéaires perlées rappelant celles de la fibronectine préfibrillaire détectée avec l'anticorps HFN 7.1 chez ces mêmes cellules. D'autre part, la présence de faisceaux rectilignes perlés de tensines hors des FAs et dans la portion centrale des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène (Figure 35E) indiquent que ce substrat d'adhésion permet de secourir – au moins partiellement – la formation de FBs en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'expression de l'ILK et du complexe PIP est facultative pour le recrutement de la tensine dans les FAs et pour l'élaboration des FBs chez les cellules HIEC qui adhèrent sur la fibronectine. Néanmoins, il semble que les fonctions de l'ILK pourraient possiblement contribuer à l'élaboration normale des FBs chez ce modèle cellulaire.

Pour terminer, nous avons évalué la contribution de l'ILK dans la formation des FBs en comparant l'organisation de la fibronectine associée aux cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine exogène. De prime abord, les immunofluorescences sans les cellules montrent une couche relativement uniforme de fibronectine exogène sur les lamelles de verre (Figure 36A). Couche qui est d'ailleurs plus facilement observable grâce aux aspérités de cette dernière en périphérie des lamelles de verre. Dans ce cas, puisque nous avons utilisé l'anticorps HFN 7.1 lors de ces immunofluorescences, cela démontre que la fibronectine exogène adsorbée à la surface des lamelles de verre est en conformation préstressée présentant les sites RGD et PHSRN (synergie) de liaison aux intégrines (Garcia et al., 1999; Keselowsky et al., 2003). D'autre part, l'organisation de la fibronectine chez les cellules HIEC siCNS et HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène est globalement comparable (Figure 36D vs 36E). Ces données s'accordent avec le fait que l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC est facultative pour l'assemblage de la fibronectine exogène en matrice fibrillaire. Cependant, nonobstant le fait que laa détection de fibrilles longues et minces dans la région centrale des cellules HIEC siILK (Figures 36D et 36F) démontre que le substrat de fibronectine exogène permet le rétablissement — au moins partiel — des fonctions de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans la fibrillogénèse de la fibronectine par les FBs, nous ne pouvons exclure que dans ces conditions l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  ait pu contribuer à l'assemblage de la matrice de fibronectine exogène. En effet, les cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène présentent régulièrement plus de formations courtes et compactes de fibronectine à l'extrémité des fibres de stress (Figures 36C, 36E et 36G). Or, ce type particulier de fibrilles et de fibres est compatible avec les

Figure 36 : Les fonctions de l'ILK chez les cellules HIEC contribuent à l'intégrité structurale de la matrice de fibronectine fibrillaire exogène

(A) Photos d'immunofluorescence de la fibronectine détectée par l'anticorps HFN 7.1 à la surface des lamelles de verre recouvertes de  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectine exogène sans cellules. Les aspérités en périphérie des lamelles de la couche de fibronectine adsorbée à la surface du verre exposent clairement la présence de cette couche. (B et C) Photos d'immunofluorescence représentatives de la codétection de la fibronectine par le HFN 7.1 (en vert) et du cytosquelette d'actine (visualisé avec la phalloïdine-TRITC; en rouge) chez des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK adhérentes sur les lamelles de verre recouvertes de fibronectine exogène. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). (D et E) Signaux d'immunofluorescence de la fibronectine uniquement chez les mêmes cellules qu'en B et C respectivement. (F) Agrandissement de la zone encadrée en D. (G) Agrandissement de la zone encadrée en E. Comparativement aux cellules HIEC siCNS qui forment généralement de longues fibrilles minces de fibronectine longeant le réseau de fibres de stress ventrales (ex. pointés par les flèches en F et B), les cellules HIEC siILK forment plus de fibrilles courtes et compactes associées avec l'extrémité des fibres de stress en périphérie de ces cellules (ex. pointés par les têtes de flèches en G et C). Barre d'échelle : A (image de gauche) :  $50\mu\text{m}$  et (B-E) en C :  $30\mu\text{m}$ .



**Figure 36**

caractéristiques qui ont précédemment été décrites concernant la MEC de fibronectine assemblée par l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta 3$  (Takahashi et al., 2007; Xu et al., 2010). Ce processus est rendu possible par la déamination spontanée d'un résidu asparagine en un résidu isoaspartate causant la formation d'un site isoDGR (isoaspartate-glycine-arginine) sur le domaine FI5 de la fibronectine (Spitaleri et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yang and Hynes, 1996). Ce site présente une plus forte affinité pour l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta 3$  que pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et permet à la première de se substituer à la seconde afin d'assembler et de déposer la fibronectine. Dans la mesure où la formation spontanée du site isoDGR est grandement accélérée lorsque la fibronectine en solution est à 4 °C (Curnis et al., 2006; Xu et al., 2010) et d'autre part, que la fibronectine plasmatique commerciale (Millipore/Chemicon®) utilisée lors de mes expériences était conservée à cette température selon les instructions du fabricant, il est donc possible que l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta 3$  ait pu contribuer à assembler la matrice de fibronectine insoluble au D.O.C. chez les cellules cultivées sur la fibronectine exogène et plus spécialement en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. Ainsi, bien que nous ayons précédemment déterminé que l'activité biologique du substrat de fibronectine exogène dans la stimulation de RhoA est équivalente à celle de la MEC de fibronectine endogène, cette dernière observation suggère que l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC est nécessaire pour l'intégrité de l'organisation fine de la matrice de fibronectine fibrillaire assemblée à partir de la fibronectine exogène.

<';^ )

<';^ )

## Discussion

La discussion débute par l'analyse des données générées chez les modèles de CEI, puis les deux dernières parties sont consacrées à l'intégration de ces données dans le contexte de l'épithélium intestinal normal. Cette discussion devrait ainsi permettre d'identifier les fonctions plausibles de l'ILK dans l'homéostasie de l'épithélium de la muqueuse intestinale humaine.

### 4.1 *Paramètre de l'expression de l'ILK et du complexe PIP chez les CEIs en culture*

La participation de l'ILK à la régulation des caractéristiques architecturales et fonctionnelles de l'axe fonctionnel MEC-intégrine-actine est en majeure partie médiée en coopération avec les protéines PINCH et parvines sous la forme du complexe adaptateur PIP. Dans ces circonstances, afin d'établir le portrait juste des mécanismes sous-jacents aux fonctions de l'ILK chez les CEIs, il est indiqué de s'intéresser d'abord aux résultats que nous avons obtenus concernant les paramètres de la participation de l'ILK au complexe PIP chez ce type cellulaire.

A priori, nos données indiquent que les niveaux protéiques de l'ILK, de PINCH-1, de l' $\alpha$ -parvine et de la  $\beta$ -parvine chez les CEIs en culture dépendent principalement du contexte cellulaire (prolifératif/indifférencié vs post-mitotique/différencié). Plus précisément, les niveaux de ces protéines sont à leur maximum chez les cellules HIEC et Caco-2/15 prolifératives et indifférenciées. Puis, ils régressent (à l'exception de la  $\beta$ -parvine-1) chez les populations postconfluentes de cellules Caco-2/15 qui cessent de proliférer et qui exécutent leur processus de différenciation (Vachon and Beaulieu, 1992), et ce, jusqu'à ce qu'ils atteignent leur minimum chez les populations uniformément différenciées de cellules Caco-2/15. Nous avons découvert que la baisse des niveaux protéiques des membres du complexe PIP chez les cellules Caco-2/15 confluentes ne peut s'expliquer – en totalité du moins – par la réduction de l'expression génétique de ces protéines. À ce sujet, une étude antérieure chez les cellules Hela a démontré que l'inhibition de la formation du complexe PIP par l'inhibition de l'expression l'ILK ou de PINCH-1 induit une baisse substantielle des niveaux cellulaires des autres membres du complexe PIP en raison de leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Fukuda et al., 2003). De plus, un article plus récent rapporte que la protéine chaperonne Hsp-90 facilite et stabilise



l'association entre l'ILK et l' $\alpha$ -parvine (Radovanac et al., 2013). Selon cet article, la désactivation de Hsp-90 entraîne l'ubiquitination de l'ILK par l'ubiquitine-ligase CHIP et la dégradation de l'ILK par le protéasome. Considérant ces informations, la diminution du niveau des membres du complexe PIP au cours de la différenciation des CEIs implique possiblement le démantèlement de ce complexe et la dégradation de ces constituants par le système ubiquitine-protéasome. L'implication des voies du protéasome dans la dégradation post-traductionnelle de PINCH-1 et des membres des parvines pourrait facilement être démontrée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur réversible du protéasome — tel que le MG-132 — chez les CEIs en culture.

Dans la même optique, les analyses des niveaux cellulaires de l'ILK et de ses partenaires de l'hétérotrimère PIP chez les cellules HIEC et Caco-2/15 traitées avec les siRNA démontrent que la formation du complexe PIP chez les CEIs est cruciale pour la stabilisation de ses constituants. Nous avons entre autres montré que l'inhibition forcée de l'expression de l'ILK par le siILK induit une baisse approximativement équivalente des niveaux protéiques des autres membres du complexe PIP (à l'exception de l'isoforme « 1 » de la  $\beta$ -parvine chez les cellules Caco-2/15). Cela suggère que la formation de l'hétérotrimère produit un effet de « stabilisation coopérative » (Buchler et al., 2005) permettant de multiplier le temps de demi-vie de ses membres en les préservant des processus de dégradation post-transcriptionnels. Évidemment, tel que mentionné plus haut, il est connu que la protéine chaperonne Hsp-90 protège l'ubiquitination de l'ILK dans le complexe PIP (Radovanac et al., 2013). Toutefois, les mécanismes permettant à ce complexe d'induire un phénomène de stabilisation coopérative pourraient, par exemple, également impliqués le recouvrement de sites d'ubiquitinations ou de clivages protéolytiques (Hinkson and Elias, 2011; Levy et al., 1996) lors de l'association mutuelle de ses membres.

Il a été démontré que des mécanismes de compétition directe entre l' $\alpha$ -parvine et la  $\beta$ -parvine d'une part, et entre les deux membres des protéines PINCH d'autre part, contrôlent l'accès et l'association de chaque membre de ces deux familles de protéine adaptatrice à leur site de liaison unique présent sur l'ILK (Chiswell et al., 2010; Fukuda et al., 2011; Zhang et al., 2004). Ainsi, dans le contexte des cellules HIEC V5-ILKwt où seule l'ILK est exprimée de façon exogène, il est conséquent d'assumer que les mêmes mécanismes de compétition directe contrôlent à l'inverse l'association de la forme endogène et de la forme exogène de l'ILK avec les quantités plus limitées des autres protéines endogènes du complexe PIP. Dans ce cas,

l'hypothèse de la stabilisation coopérative des membres de ce complexe propose que notre incapacité à surexprimer l'ILK de type sauvage chez les cellules HIEC V5-ILKwt peut s'expliquer par un nivellement stoechiométrique du bassin cellulaire total de l'ILK (endogène + V5-ILKwt) aux quantités endogènes plus basses de PINCH et/ou des parvines. Ce processus serait médié par la dégradation rapide des bassins excédentaires et demeurant libres (hors du PIP) des formes endogènes et exogènes de l'ILK. Ce scénario est également conforté par les faibles niveaux protéiques du variant muté V5-ILKkd que nous avons détecté chez les cellules HIEC V5-ILKkd. Puis, par le fait que contrairement à la construction V5-ILKwt chez les cellules HIEC V5-ILKwt, l'expression du V5-ILKkd n'induit pas de diminution apparente de l'ILK endogène chez les cellules HIEC V5-ILKkd. En effet, la mutation spécifique E359K de la construction V5-ILKkd a précédemment été décrite pour empêcher la formation du complexe PIP et le recrutement de l'ILK dans les FAs en inhibant l'association entre l'ILK et les membres des parvines (Nikolopoulos and Turner, 2001; Nikolopoulos and Turner, 2002). Cependant, puisque nous détectons tout de même des quantités non négligeables du marqueur moléculaire V5 chez les cellules HIEC V5-ILKkd, cela tend à démontrer qu'une portion du bassin cellulaire total de l'ILK peut être maintenue — que ce soit de façon stable ou transitoire — sans être associée aux membres des parvines.

Notre incapacité à exprimer des niveaux pratiques des constructions V5-ILKwt et V5-ILKkd chez les cellules HIEC peut sembler surprenante considérant que la littérature montre qu'il est possible de surexprimer l'ILK de type sauvage et ses variants mutés chez de nombreux modèles cellulaires aux origines variées (Cordes, 2004; Huang et al., 2006; Khyrul et al., 2004; Somasiri et al., 2001). En plus des différences concernant les approches expérimentales (p. ex. l'établissement de lignées dérivées de clones sélectionnées pour leurs niveaux d'expression élevés de l'ILK (Delcommenne et al., 1998; Hannigan et al., 1996)), des distinctions dans la dynamique fonctionnelle entre les membres du complexe PIP selon le contexte et/ou le type cellulaire peuvent également expliquer cette disparité entre la littérature et nos résultats chez les cellules HIEC. Par exemple, deux modes distincts d'interactions et de recrutement de l'ILK et de ses partenaires habituels de l'hétérotrimère PIP dans les sites d'adhésion ont été identifiés chez la drosophile, dont un chez les cellules épithéliales des ailes où les trois protéines du complexe sont interdépendantes (Vakaloglou and Zervas, 2012). De plus, l'existence de distinctions dans la dynamique fonctionnelle des membres du complexe PIP entre les différents types cellulaires de



mammifères est également démontrée. Ainsi, chez certains modèles cellulaires le recrutement de l'ILK dans les FAs dépend de son interaction directe et/ou indirecte avec la protéine adaptatrice paxilline (Nikolopoulos and Turner, 2001; Nikolopoulos and Turner, 2002). Alors que chez d'autres, il semble que ce ne soit pas le cas (Stanchi et al., 2009; Wickstrom et al., 2010b). Finalement, contrairement à ce qui était initialement présumé et généralisé pour l'ensemble des lignées cellulaires en culture, il a été établi par les travaux de Sandfort et coll. (2010) qu'il existe souvent peu de corrélation entre les niveaux protéiques des membres du complexe PIP chez les lignées cellulaires d'origines cancéreuses (p. ex. A549, MDA-MB231, CCL221) (Sandfort et al., 2010). Globalement, ces informations suggèrent que l'équilibre relativement direct qui est maintenu entre les niveaux des membres du complexe PIP chez les cellules HIEC et Caco-2/15 soit une caractéristique du mode relationnel existant entre ces protéines chez les CEIs.

Il est typiquement considéré que l'assemblage du complexe PIP s'effectue dans le compartiment cytoplasmique et que l'adhésion cellulaire permet la translocation hâtive de ce complexe vers les FAs (Wickstrom et al., 2010b; Zhang et al., 2002). Or, il a été démontré que l'ILK contribue à la stabilisation membranaire des intégrines dans les FAs (Mainali and Smith, 2013). De plus, des travaux chez la drosophile indiquent que dans cet organisme l'ILK et la sous-unité  $\beta$  des intégrines sont réparties au sein de deux populations principales (Yuan et al., 2010). Soit une au renouvellement lent qui réside dans les FAs persistants. Puis, une autre plus mobile dont la distribution et la dynamique dépendent principalement des mécanismes d'endocytose de type clathrine-dépendant responsable de l'assemblage et du désassemblage des structures d'adhésion transitoires. Ainsi, le faible marquage résiduel des protéines du complexe PIP que nous avons décrit au niveau des FAs immatures des cellules HIEC siILK pourrait être associé à des sous-populations plus stables des membres du complexe PIP présentes dans les FAs persistants de ces cellules. Le marquage cytoplasmique variable de ces mêmes protéines serait dans ce cas possiblement formé — au moins en partie — par les sous-populations plus labiles de ces protéines qui sont associées aux vésicules endosomales et/ou avec d'autres structures du système endomembranaire. Cette hypothèse pourrait être confirmée par des codétectons en immunofluorescence des membres du complexe PIP et de protéines connues pour être spécifiquement associées avec les différentes structures de l'endosome telles que les membres de la famille Rab (Delevoye and Goud, 2015).

En résumé, les données analysées dans cette première partie de la discussion démontrent que l'expression du complexe PIP est cruciale pour la stabilisation et le maintien de l'essentiel des bassins cellulaires de ses membres chez les CEIs. De plus, elles suggèrent que le recrutement de ce complexe dans les sites d'adhésion des intégrines contribue également à la stabilisation de ses membres dans les FAs des CEIs en culture.

#### *4.2 Rôle de l'expression et de l'adhésion sur la fibronectine dans le contrôle des niveaux cellulaires et de la distribution de l'ILK chez les CEIs en culture*

À l'image du patron de distribution des membres du complexe PIP détecté à la base des CEIs de l'axe crypte-villosité humain, nos travaux et ceux d'études antérieures chez l'humain et le rat indiquent que la présence de fibronectine dans la MEC (et la lame basale) de la muqueuse intestinale est plus intense à la base des cryptes et qu'elle décroît rapidement dans les villosités (Beaulieu, 1992; Gagne et al., 2010; Quaroni et al., 1978; Simon-Assmann et al., 1986). Une corrélation entre l'expression de la fibronectine et les niveaux des membres du complexe PIP en fonction du contexte cellulaire (prolifératif vs différencié) existe également chez les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15. Plus exactement, alors que les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 indifférenciées expriment des niveaux substantiels de fibronectine (Gagne et al., 2010; Groulx et al., 2011; Vachon et al., 1995), l'induction forcée de la différenciation des cellules HIEC (thèse de doctorat; Yannick Benoit (2010)) et la progression du processus de différenciation chez les cellules Caco-2 cultivées à postconfluence (Levy et al., 1998; Vachon et al., 1995) entraîne une diminution marquée de l'expression de cette protéine.

En parallèle, nos travaux indiquent que l'adhésion des CEIs en culture sur la fibronectine stimule le recrutement du complexe PIP dans les sites d'adhésion cellule-MEC. Plus précisément, une portion importante du bassin cellulaire des membres du complexe PIP localise avec les FAs des cellules HIEC et ces cellules expriment et déposent efficacement leur MEC de fibronectine. Nous avons également établi que l'adhésion des cellules Caco-2/15 préconfluentes sur la fibronectine exogène augmente significativement le nombre moyen des plaques d'adhésion basale de type FA détectées par l'anticorps contre l'ILK en immunofluorescence. Or, les travaux de recherches antérieures par le Pr Vachon et ses collaborateurs ont montré d'une part que les cellules Caco-2/15 sous-confluentes déposent peu efficacement la fibronectine cellulaire qu'elles

sécrètent du côté de leur pôle membranaire ventral/basal (Vachon et al., 1995). Et d'autre part, que la déposition des principaux constituants de la lame basale intestinale – dont la fibronectine – à l'interface des cellules Caco-2/15 cultivées sur une couche de cellules mésenchymateuses intestinales humaines (HIM), provoque une redistribution de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines vers le pôle membranaire basal des cellules Caco-2/15 (Vachon et al., 1993). Les effets stimulants du substrat de fibronectine exogène sur la présence de l'ILK dans les plaques d'adhésion basale des cellules Caco-2/15 semblent ainsi associés à la redistribution des intégrines vers ces sites. Il serait pertinent de vérifier dans ce cas si le recrutement de l'ILK dans les FAs des cellules Caco-2/15 est également associé à une augmentation des FAs marqués par la vinculine en immunofluorescence. Néanmoins, dans l'ensemble ces données indiquent que les interactions entre les intégrines et les constituants de la MEC — dont plus spécialement celles avec la fibronectine — stimulent le recrutement du complexe PIP dans les FAs des CEIs en culture.

Il est connu que le complexe PIP peut s'associer avec les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 3$  des intégrines (Wickstrom et al., 2010b). De plus, mes travaux et/ou ceux d'autres recherches indiquent que les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (HIEC et Caco-2),  $\alpha 8\beta 1$  (HIEC),  $\alpha v\beta 3$  (HIEC et Caco-2) et  $\alpha v\beta 5$  (Caco-2) sont exprimées et fonctionnelles pour l'adhésion RGD/fibronectine-dépendante chez les cellules HIEC et Caco-2/15 (Beausejour et al., 2013; Benoit et al., 2009; Coconnier et al., 1994; Gagne et al., 2010; Groulx et al., 2011; Walter et al., 1997). Le complexe PIP est donc susceptible d'interagir avec plusieurs types d'intégrines dans les sites d'adhésion cellule-MEC des CEIs en culture. Or, l'ILK et ses partenaires habituels du PIP sont en partie détectés selon un marquage linéaire perlé analogue de celui de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de la tensine formant les FBs chez les cellules HIEC. Puis, nous avons clairement établi un lien fonctionnel entre l'expression de l'ILK et le processus de fibrillogénèse de la fibronectine chez les cellules HIEC (ce sujet sera analysé plus en profondeur dans la section 4.3 de la discussion). Ainsi, il semble que l'expression de l'ILK et la formation du complexe PIP chez les CEIs en culture pourraient être particulièrement importantes pour les fonctions de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui est considérée comme la principale intégrine responsable de la fibrillogénèse de la fibronectine (Singh et al., 2010). En ce sens, nos résultats s'accordent avec ceux de Wu et coll. qui rapportaient dès 1998 une augmentation significative de l'assemblage de la fibronectine, ainsi que de la codistribution entre l'ILK et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  chez des clones de cellules IEC-18 exprimant une forme sauvage exogène de l'ILK (Wu et al., 1998). Dans la même optique, une étude réalisée en partie chez les

cellules Caco-2 par Camacho-Leal et coll. (2007), rapporte que la stimulation artificielle de l'agrégation de la molécule d'adhésion intercellulaire CEACAM6 induit le recrutement et l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  — mais non de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  — au sein de microdomaines membranaires spécifiques (Camacho-Leal et al., 2007). Ce phénomène est corrélé avec le recrutement PI3K-dépendant de l'ILK au sein des mêmes microdomaines membranaires que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . De plus, d'après cette étude l'inhibition de l'expression de l'ILK par un siRNA empêche les effets de l'agrégation de CEACAM6 conduisant (chez les cellules exprimant l'ILK) à une augmentation de l'adhésion des cellules sur la fibronectine. Ainsi, dans l'ensemble ces informations soutiennent un scénario où en réponse à la signalisation de type *outside-in* induite par les interactions initiales entre les intégrines des CEIs et la MEC, le recrutement de l'ILK et du complexe PIP dans les sites d'adhésion cellule-MEC soit important pour réguler les fonctions des intégrines et plus spécifiquement afin de réguler les fonctions de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  envers la fibronectine.

D'autre part, il est connu que la progression du processus de différenciation des cellules Caco-2/15 est associée avec une inhibition de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Beausejour et al., 2013), de même qu'avec une redistribution latérale de cette intégrine lors des stades précoces de ce processus (Coconnier et al., 1994). Ainsi, en plus d'être distribuée dans les sites d'adhésion cellule-MEC, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  localise également au niveau des sites de contact intercellulaire chez les cellules Caco-2 formant une monocouche (Coconnier et al., 1994; Vachon et al., 1993). Cette distribution cellulaire particulière de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  se fait sans la fibronectine (Larjava et al., 1990) et en ce sens, des travaux plus récents chez les fibroblastes embryonnaires de souris démontrent que l'adhésion de ces cellules sur la fibronectine contrôle la distribution de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  – dans un complexe avec la tensine, la N-cadhérine et la  $\beta$ -caténine — entre les sites d'adhésion cellule-MEC et les sites d'adhésion cellule-cellule de type jonction adhérente (Lefort et al., 2011). Or, rappelons que nous avons montrés que l'augmentation de l'ILK au niveau des plaques d'adhésion de type FA chez les cellules Caco-2/15 adhérentes sur la fibronectine exogène coïncide avec une diminution significative de la détection de l'ILK au niveau de l'interface membranaire latérale des cellules adjacentes. Ces informations soulèvent donc la possibilité intrigante que les mécanismes associés au contrôle de la distribution cellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (et/ou d'un autre type d'intégrine) par la fibronectine puissent être impliqués avec la redistribution de l'ILK que nous avons dénotée lorsque les cellules Caco-2/15 atteignent

la confluence. Plus précisément, la dégression de l'expression de la fibronectine chez les cellules Caco-2/15 confluentes pourrait entraîner la redistribution intégrine-dépendante du complexe PIP (et/ou d'un autre type d'intégrine) vers les domaines membranaires latéraux de ces cellules. Puis, l'inhibition progressive de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  chez les cellules Caco-2/15 se différenciant pourrait interférer avec la stabilisation du complexe PIP et conduire à la dégradation de ses membres. Évidemment, ce mécanisme demeure totalement spéculatif considérant que nous n'avons pas démontré que l'ILK localise précisément dans les sites d'adhésion intercellulaire des cellules Caco-2/15, ni étudié spécifiquement les processus régulant la distribution cellulaire de l'ILK chez ce modèle des CEIs. Toutefois, la confirmation d'une association fonctionnelle entre l'ILK et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (et/ou d'un autre type d'intégrine) appuierait la possibilité de l'implication de ce mécanisme dans les effets de l'adhésion sur la fibronectine sur la distribution de l'ILK entre les sites d'adhésion cellule-MEC et l'interface membranaire latérale des cellules Caco-2/15, mais également dans la régulation de la distribution de l'ILK lorsque ces cellules atteignent la confluence et se différencient.

Pour terminer, il est intéressant de faire un rapprochement entre la régulation de la distribution cellulaire de l'ILK par la fibronectine chez les cellules Caco-2/15 et la redistribution du bassin de l'ILK des FAs vers les sites d'adhésion intercellulaire qui a été décrite par Vespa et coll. (2003, 2005) (Vespa et al., 2005; Vespa et al., 2003). Ces études rapportent en outre que l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'ILK est importante afin de ne pas interférer avec la cinétique de formation des jonctions serrées chez des cultures primaires de kératinocytes artificiellement induites à se différencier par la technique du « calcium switch ». Et d'autre part, avec la translocation initiale de la E-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine vers les jonctions adhérentes en formation de ces cellules (Vespa et al., 2005). Ainsi, dans la mesure où l'adhésion sur la fibronectine inhibe le recrutement des membres des cadhérines dans les sites d'adhésion intercellulaire des cellules épithéliales polarisées (Sakai et al., 2003a; Weber et al., 2011), il serait pertinent de vérifier l'implication potentielle de l'ILK et ses partenaires dans les premières étapes de l'élaboration des sites d'adhésion intercellulaire des cellules Caco-2/15. Cependant, une telle contribution serait facultative pour le processus de différenciation de ces cellules puisque nos travaux indiquent que l'inhibition de l'expression de l'ILK n'affecte pas l'expression de marqueurs de différenciation des cellules Caco-2/15 confluentes.

Dans l'ensemble, les données discutées dans ce segment de la discussion proposent l'existence d'un lien fonctionnel direct dans la régulation de l'expression spatio-temporelle du complexe PIP, des intégrines (et plus particulièrement de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ ) et de la fibronectine chez les CEIs.

#### *4.3 Le rôle de l'ILK dans l'assemblage de la forme soluble de la fibronectine endogène concerne spécifiquement les étapes permettant d'initier le processus de fibrillogénèse*

À l'image de ce qui a précédemment été rapporté chez les cellules IEC-18 et d'autres types de modèles cellulaires (Chen et al., 2006; Guo and Wu, 2002; Li et al., 2009; Lorenz et al., 2007; Shi et al., 2008; Stanchi et al., 2009; Vouret-Craviari et al., 2004; Wu et al., 1998), il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de l'ILK et la capacité des cellules HIEC à assembler une matrice de fibronectine fibrillaire. Une étude phare de Stanchi et coll. (2009) rapporte à ce sujet que chez les fibroblastes embryonnaires de souris le complexe PIP sert de plateforme pour le recrutement de la tensine dans les FAs. Cette fonction est critique dans le renforcement du lien intégrine-actine permettant la ségrégation des FBs et la fibrillogénèse de la fibronectine chez ces cellules (Stanchi et al., 2009). Ces auteurs suggèrent de plus qu'à l'image des invertébrés, ce mécanisme serait constitutif chez les cellules de mammifères. En ce sens, le complexe PIP est en général considéré comme un constituant essentiel pour la stabilité de l'interface intégrine/actine (Ghatak et al., 2013). Pourtant, ce mécanisme ne concorde pas avec le fait que le processus de fibrillogénèse de la fibronectine est restauré chez les cellules HIEC siILK cultivées sur un substrat de fibronectine exogène. De plus, il est possible de relever des différences significatives entre les résultats de Stanchi et coll. (2009) et ceux que nous avons obtenus chez les cellules HIEC. D'abord, alors que la tensine cesse de localiser dans les FAs des fibroblastes ILK<sup>-/-</sup> (Stanchi et al., 2009), la tensine est toujours recrutée dans les FAs immatures des cellules HIEC siILK et demeure bloquée dans ces structures lorsque ces cellules sont cultivées sur une surface N.R. La formation des FBs et le marquage fibrillaire de la tensine et la fibrillogénèse de la fibronectine sont de plus rétablis lorsque les cellules HIEC siILK sont cultivées sur la fibronectine exogène. D'autre part, alors que Stanchi et coll. rapportent que la stimulation de la contractilité cellulaire RhoA-dépendante cause le détachement des faisceaux de filaments d'actine associés aux sites d'adhésion cellule-MEC, suivit d'un désétalement des fibroblastes

ILK<sup>-/-</sup> adhérents sur la fibronectine exogène (Stanchi et al., 2009). Des conditions expérimentales équivalentes lors de nos essais de stimulation avec le sérum bloquent complètement le désétalement des cellules HIEC siILK qui est normalement observé lorsque ces mêmes essais sont exécutés sans le substrat exogène de fibronectine. En ce qui nous concerne, nous ne pouvons exclure que les bassins résiduels des membres du complexe PIP qui demeurent détectés dans les FAs immatures en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK puissent permettre le recrutement de la tensine et que cela contribue à la stabilisation de l'interface intégrine-actine des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène. Cependant, contrairement aux effets de ce substrat chez ces cellules, la seule présence de tensine dans les FAs immatures des cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. est à l'évidence insuffisante pour permettre à ces cellules d'assembler la fibronectine endogène soluble en matrice fibrillaire. Ainsi, considérant qu'il a précédemment été établi que la cohésion du lien adhésif cellule-MEC est typiquement proportionnelle à la densité des complexes intégrine  $\alpha5\beta1$ -fibronectine (Garcia et al., 1998b; Garcia et al., 1998c; Roca-Cusachs et al., 2009), cela suggère fortement que le substrat de fibronectine exogène qui est converti en MEC fibrillaire permet de restaurer les propriétés de la MEC et/ou du lien intégrine-MEC des cellules HIEC siILK. Cela expliquerait donc pourquoi ces cellules sont en mesure de soutenir leur adhésion/étalement périphérique suivant l'augmentation brusque des forces de tension contractile lors des essais de stimulation au sérum. Corolairement, à l'image du détachement entre la membrane plasmique et la MEC qui est rapporté chez les cellules musculaires de souris et de poisson-zèbres déficientes pour l'expression de l'ILK (Postel et al., 2008; Wang et al., 2008a), le phénomène de collapse de la membrane plasmique des cellules HIEC siILK stimulé par le sérum sur une surface N.R. peut selon toute vraisemblance être attribué au détachement des sites d'adhésion cellule-MEC périphérique de ces cellules (Gilcrease, 2007). Prises ensemble, ces informations indiquent que le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans la fibrillogénèse de la fibronectine endogène soluble permet la consolidation de l'interface cellule-MEC des cellules HIEC cultivées sur une surface N.R. Qui plus est, nos résultats démontrent clairement que le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans la fibrillogénèse de la forme soluble de la fibronectine chez les cellules HIEC nécessite une contribution différente que celle impliquant le complexe PIP dans le recrutement de la tensine et la stabilisation de l'interface intégrine-actine.

La voie RhoA/ROCK/p<sup>S19</sup>MLC est typiquement considérée comme centrale dans la formation des fibres de stress permettant l'assemblage de la fibronectine (Zhong et al., 1998). En ce sens, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de ROCK enraye la déposition de la fibronectine endogène chez les cellules HIEC (siCNS). Or, plusieurs études rapportent que l'ILK régule l'activité de RhoA et le niveau de p<sup>S19</sup>MLC par des fonctions intracellulaires directes (Barker et al., 2005; Deng et al., 2002; Huang et al., 2006; Khyrul et al., 2004; Kiss et al., 2002; Kogata et al., 2009; Maier et al., 2008; Muranyi et al., 2002; Pereira et al., 2009). Cela suggère à l'évidence que chez les CEIs, l'ILK pourrait également contribuer directement à la stimulation des fonctions de RhoA dans l'assemblage de la fibronectine. Toutefois, les niveaux de RhoA membranaires actifs et de p<sup>S19</sup>MLC sont totalement rétablis chez les cellules HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène. Cela démontre donc que les fonctions intracellulaires putatives directes de l'ILK ne sont pas déterminantes pour la stimulation de la voie RhoA/ROCK/p<sup>S19</sup>MLC permettant l'assemblage de la fibronectine chez les cellules HIEC. Ainsi, cela tend à démontrer que la baisse substantielle de l'activité de cette voie chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. résulte de l'entrave de l'assemblage de la fibronectine soluble en matrice fibrillaire dans ces conditions. Corolairement, cela indique que le rôle du complexe PIP dans l'assemblage de la fibronectine chez les cellules HIEC serait indirectement impliqué dans la stimulation de la voie RhoA/ROCK/p<sup>S19</sup>MLC par les effets mécanodépendants de la matrice de fibronectine fibrillaire sur l'activation optimale de cette voie. Cette interprétation de nos résultats s'accorde d'ailleurs avec le fait qu'il soit établi dans la littérature que les interactions spécifiques permettant à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  d'assembler la forme soluble de la fibronectine en matrice fibrillaire conduisent à la stimulation de RhoA (Huveneers and Danen, 2009; Morgan et al., 2009). Puis, avec le fait qu'il soit également connu que les mécanismes mécanosensitifs associés aux structures d'adhésion cellulaire modulent en permanence l'activité de la voie RhoA/ROCK afin que les forces contractiles développées par les faisceaux d'actomyosine soient en équilibre constant avec les propriétés mécaniques (rigidité vs élasticité) de la MEC (Hocking et al., 2000; Moore et al., 2010).

Deux questions émergent donc à la lumière des données discutées jusqu'à maintenant dans cette section, soit : 1) quel est le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans les mécanismes responsables de la fibrillogénèse de la fibronectine des CEIs? 2) Comment réconcilier ce rôle avec le fait que nos résultats démontrent que l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les



cellules HIEC (siILK) enraye la fibrillogénèse de la forme soluble de la fibronectine endogène, mais non celle de la fibronectine exogène adsorbée?

En ce qui concerne la première question, nos résultats suggèrent que l'expression de l'ILK et du complexe PIP chez les CEIs soit importante pour l'intégrité des interactions fonctionnelles entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la fibronectine au niveau des sites d'assemblage de la fibronectine. D'abord, selon le modèle *switchblade* de l'activation des intégrines, la conformation active de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  1) présente le site de liaison à la séquence RGD, 2) permet l'échafaudage du lien cytoplasmique avec le réseau de microfilaments d'actine et 3) stimule le recrutement de cette intégrine dans les sites d'adhésion cellule-MEC (Askari et al., 2009; Mould et al., 1997; Takagi, 2004; Takagi et al., 2003). Or, chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R., l'anticorps mAB16 — qui en principe reconnaît en immunofluorescence les formes actives de l'intégrines  $\alpha 5\beta 1$  dont le site de liaison à la séquence RGD est allostériquement accessible — détecte principalement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  au niveau de certains FAs immatures et des fibres de stress dorsales et arcs transverses qui leur sont associées. Cela indique que l'expression de l'ILK et du complexe PIP ne joue pas un rôle essentiel pour l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  chez les cellules HIEC. Pour sa part, la tensine est également détectée sur la face interne des FAs immatures chez les cellules HIEC siILK. De façon intéressante, ce sont précisément ces mêmes structures de l'axe intégrine-actine (FAs immatures, fibres dorsales et transverses) qui sont impliquées dans l'élaboration des FBs et des fibres de stress ventrales lors du processus d'étalement anisotropique (Tojkander et al., 2012). Prises ensemble, ces informations indiquent que l'inhibition de l'expression de l'ILK (et du complexe PIP) chez les cellules HIEC n'empêche pas l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et le recrutement des principaux constituants des FBs ( $\alpha 5\beta 1$ , tensine) dans les structures de l'axe intégrine-actine qui sont normalement impliquées dans l'initiation de l'assemblage de la fibronectine et la formation des FBs.

D'autre part, bien qu'à l'évidence les immunofluorescences avec l'anticorps HFN 7.1 — qui reconnaît un site cryptique entre les sites PHSRN/synergie et RGD de la fibronectine — détectent moins de fibronectines à la surface des cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R., plusieurs de ces cellules forment toujours des agrégats de fibronectine préfibrillaire. Ces agrégats colocalisent avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans de courtes structures linéaires perlées qui ont tendance à se concentrer selon le même type d'organisation que les structures de l'axe intégrine-actine près de la lame intérieure de la membrane plasmique des HIEC siILK. Cette région correspond

également avec la région de la membrane plasmique où est normalement initié l'assemblage de la fibronectine préfibrillaire en MEC fibrillaire à la surface des cellules (Baneyx et al., 2001; Tomasini-Johansson et al., 2006). Or, selon les modèles courants, l'auto-association de la fibronectine et l'agrégation des intégrines se font en parallèle et ces deux processus sont importants pour induire les conformations intermédiaires partiellement étirées de la fibronectine qui permettent d'enclencher le processus de fibrillogénèse (Baneyx et al., 2002; Gudzenko and Franz, 2015; Schwarzbauer and DeSimone, 2011; Singh et al., 2010). Considérant ces dernières informations, il semble peu probable que l'inhibition de l'expression de l'ILK empêche l'association initiale de la fibronectine soluble avec les intégrines. Ce serait plutôt les étapes permettant à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  d'initier la fibrillogénèse à partir des conformations intermédiaires adoptées par la fibronectine préfibrillaire à partir la forme soluble initiale de cette protéine qui seraient entravées au niveau des sites de formation des FBs des cellules HIEC siILK.

Pour ce qui est de la deuxième question, nos résultats suggèrent que ce sont les modifications de la conformation des homodimères de fibronectine exogène adsorbée qui permettent d'outrepasser le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans l'initiation de l'assemblage de la fibronectine chez les cellules HIEC siILK cultivées sur ce substrat de remplacement. En effet, il est bien connu que l'adsorption de la fibronectine modifie sa conformation et que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  est sensible à ces modifications (Faucheux et al., 2006; Garcia et al., 1999; Keselowsky et al., 2003). Par exemple, il est rapporté que l'adsorption de la fibronectine au polystyrène traité des pétris permet l'extension de la fibronectine en conformation « préstressée » présentant les sites cryptiques de liaison aux intégrines, ce qui augmente par le fait même la capacité de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  — mais non de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  — à utiliser la fibronectine (Garcia et al., 1999; Keselowsky et al., 2003). L'adsorption de la fibronectine serait donc suffisante afin de secourir sa fibrillogénèse en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. D'autre part, les changements de conformation de la fibronectine dépendent de ses interactions avec la surface du support matériel (Garcia et al., 1998a; Ogawa et al., 2015). Considérant que l'adsorption de la fibronectine est en principe bloquée par l'occupation préalable des sites chargés de la surface des pétris par les protéines du milieu de culture cellulaire (Grinnell and Feld, 1982), cela explique potentiellement pourquoi contrairement à la fibronectine adsorbée, la fibronectine endogène soluble sécrétée dans le milieu des cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. n'est pas assemblée par ces dernières. Cela expliquerait également pourquoi contrairement au substrat de

fibronectine exogène adsorbée, la fibronectine exogène soluble ajoutée dans le milieu de ces cellules lorsqu'elles sont précultivées sur une surface N.R. n'a pas permis de secourir leur phénotype contractile. Par ailleurs, nous avons pu visualiser la couche de fibronectine plasmatique humaine (sans les cellules) déposée sur les lamelles de verre avec l'anticorps HFN 7.1, ce qui confirme qu'au moins une portion de la fibronectine déposée sur ce verre adopte une conformation préstressée sans nécessiter la présence des sites chargés (Fauchoux et al., 2006; Garcia et al., 1999). Cela propose par le fait même que ce sont les conformations de la fibronectine exogène adsorbée et non les effets mécanodépendants permis par les caractéristiques mécaniques du substrat de fibronectine exogène qui permettent de secourir le phénotype contractile des cellules HIEC siILK. Cette interprétation de nos résultats est d'ailleurs appuyée par la démonstration par Carrarer et coll. (2013) que les effets de la conformation de la fibronectine priment sur les effets mécanodépendants de la rigidité du substrat en ce qui a trait à la régulation du processus d'assemblage de la fibronectine (Carraher and Schwarzbauer, 2013).

Dans le même ordre d'idée, le fait que les cellules HIEC siILK ensemencées sur un substrat de collagène I exogène récupèrent partiellement leur capacité à assembler la fibronectine endogène soluble en matrice fibrillaire insoluble au détergent désoxycholate suggère que ce sont les interactions entre la fibronectine endogène et le collagène I qui permettent de court-circuiter le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans ce processus. Dans ce cas, il faut savoir que l'assemblage des fibrilles de collagène I dans la MEC se fait en collaboration avec le processus de fibrillogénèse de la fibronectine (Kadler et al., 2008) et que les interactions entre le collagène I et la fibronectine sont rapportées pour moduler les fonctions de cette dernière (Garcia et al., 1999; Sottile et al., 2007). Par exemple, il est connu que la déposition de la fibronectine soluble à la surface d'un substrat de collagène génère des interactions qui entraînent l'exposition de sites cryptiques de la fibronectine et l'adoption par cette dernière d'une conformation décrite comme étant particulièrement favorable pour la liaison à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Garcia and Boettiger, 1999). Remarquablement, les travaux de Groulx et coll. (2011) dans le laboratoire du Pr Beaulieu ont démontré que le collagène VI qui est exprimé et assemblé dans la MEC par les cellules HIEC a des effets opposés sur l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et que cela contribue à réguler négativement la déposition RhoA/ROCK-dépendante de la fibronectine chez ce modèle de CEI (Groulx et al., 2011). Dans l'ensemble, les effets réhabilitants des substrats exogènes de fibronectine et de collagène I sur le processus de fibrillogénèse en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK s'accordent avec

l'hypothèse que le rôle de l'ILK et du complexe PIP dans l'initiation de l'assemblage de la fibronectine endogène concerne la mise en place des interactions opérantes entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et ses sites d'interactions spécifiques sur la fibronectine.

De façon plus générale, les données présentées dans cette section supportent que chez les CEIs la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , le complexe PIP et le réseau de filaments d'actine forment l'axe fonctionnel fibronectine-intégrine/PIP-actine servant spécifiquement à enclencher l'assemblage de la fibronectine à partir de sa forme soluble initiale lors des étapes précoces du processus de fibrillogénèse.

#### 4.4 *Proposition de mécanismes généraux par lesquels l'ILK pourrait réguler les interactions fonctionnelles entre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la fibronectine*

Une méta-analyse statistique récente de Horton et coll. (2015) intégrant les données de leur analyse protéomique des sites d'adhésion des intégrines chez les fibroblastes de souris aux données provenant des principaux travaux de recherches antérieures du même type chez d'autres modèles cellulaires (p. ex. K562, A375, HFF), classe l'axe PINCH-ILK-kindline parmi les quatre principaux axes fonctionnels cellulaires des FAs (Horton et al., 2015). Remarquablement, cette même étude rapporte que l'ILK, PINCH-1 et l' $\alpha$ -parvine — avec les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$  et les partenaires du complexe PIP paxilline, IQGAP1 et Rsu-1 — compte parmi les 63 principales protéines du « méta-adhesome » dont l'augmentation dans les sites d'adhésion des intégrines est la plus marquée et consensuelle chez les cellules qui adhèrent sur la fibronectine (Horton et al., 2015). Des travaux supplémentaires seraient évidemment nécessaires afin d'identifier les intégrines et les mécanismes précis impliquant l'ILK et le complexe PIP dans le processus de fibrillogénèse chez les CEIs. Toutefois, plusieurs informations provenant de la littérature sont compatibles avec nos résultats et nous permettent de proposer deux mécanismes généraux par lesquels l'expression de l'ILK et du complexe PIP pourrait réguler les interactions entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine afin de permettre la fibrillogénèse.

En premier lieu, il est possible que le recrutement du complexe PIP aux sites d'adhésion cellule-MEC permette de moduler la conformation active de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  afin d'aligner correctement ses sites d'interactions avec la fibronectine préfibrillaire. Ce rôle permettrait ainsi d'augmenter l'affinité et la stabilité du complexe  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine et ainsi de procéder aux

étapes subséquentes de l'initiation du processus de fibrillogénèse. Ce mécanisme est suggéré par le fait qu'il est bien établi par la littérature que les intégrines actives adoptent différentes conformations présentant différents niveaux d'affinités pour leur ligand (Mould and Humphries, 2004). En outre, l'utilisation lors de différentes recherches d'une variété d'anticorps modulant l'état d'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a permis d'identifier plusieurs conformations actives distinctes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  supportant différentes forces de liaison à la fibronectine par ses séquences RGD du domaine FNIII<sub>10</sub> et PHSRN/synergie du domaine FNIII<sub>9</sub> (Danen et al., 1995; Garcia et al., 2002; Garcia et al., 1998c). Or, au moins une de ces conformations a été identifiée pour stimuler la translocation interne de cette intégrine et l'assemblage de la fibronectine fibrillaire par les FBs (Clark et al., 2005). De plus, rappelons que ce sont les interactions spécifiques permises par l'orientation et la distance précise entre la séquence RGD et PHSRN/synergie de la fibronectine et leur site d'interaction sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui supporte l'effet synergique responsable de la prise en charge efficace de la tension contractile, de même que la capacité de cette intégrine à assembler la fibronectine (Friedland et al., 2009; Huveneers et al., 2008; Keselowsky et al., 2003; Schmidt and Kao, 2007; Sechler et al., 1997). Dans ce contexte, il est invitant de faire un rapprochement entre ce mécanisme que nous proposons chez les CEIs et ce qui a précédemment été rapporté concernant les fonctions de l'ILK chez les plaquettes sanguines. En effet, il semble que les fonctions de l'ILK chez ce type cellulaire soient facultatives pour l'activation de l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ , mais importantes afin de réguler l'intégrité conformationnelle de la forme active de cette intégrine (Honda et al., 2009) et son affinité envers le fibrinogène (Honda et al., 2009; Pasquet et al., 2002; Tucker et al., 2008). Or, d'une part l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  est la seule intégrine hormis  $\alpha 5\beta 1$  qui possède simultanément les sites de liaison pour les séquences RGD et PHSRN de la fibronectine (Leiss et al., 2008). Et d'autre part, le fibrinogène est également un ligand RGD-dépendant connu de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Ly et al., 2003). Les fonctions de l'ILK pourraient donc affecter l'affinité de ces deux intégrines pour leurs ligands RGD-dépendants d'une manière semblable. Par ailleurs, l'association entre le domaine cytoplasmique des intégrines et le complexe PIP pourrait réguler la stabilité du complexe  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectine par les interactions directes de l'hétérotrimère avec les intégrines ou par ses fonctions adaptatrices pour d'autres protéines. Par exemple, il a été démontré que le recrutement de la kindline-2 aux sites d'adhésion des intégrines des cellules endothéliales stimule le recrutement de l'ILK dans ces formations (Montanez et al., 2008). Or, les kindlines sont

reconnues pour leur rôle dans la régulation des fonctions des intégrines (Bottcher et al., 2009; Montanez et al., 2008; Ussar et al., 2008). De plus, une étude récente démontre que le recrutement de la kindline-2 dans les FAs par le complexe PIP conduit à l'activation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  chez les fibroblastes NIH3T3 (Huet-Calderwood et al., 2014). Qu et coll. (2011) rapportent également que la kindline-2 stimule le processus de fibrillogénèse de la fibronectine chez les podocytes rénaux de façon PI3-K-dépendante. Dans ce cas, le recrutement de la kindline-2 aux intégrines de ces cellules se fait d'une façon indépendante de son association directe avec les phosphoinositides (Qu et al., 2011). Ainsi, sachant que le recrutement de l'ILK aux intégrines est stimulé par la PI3-K (Camacho-Leal et al., 2007; Delcommenne et al., 1998; Wang et al., 2011; Yuan et al., 2011), il serait pertinent d'analyser si des interactions potentielles entre l'ILK et les membres des kindlines contribuent aux fonctions de l'axe fibronectine- $\alpha 5 \beta 1$ /PIP-actine dans l'initiation de la fibrillogénèse de la fibronectine chez les CEIs. À ce sujet, il est intéressant de mentionner que des analyses par immunobuvardages et par immunofluorescences que j'ai récemment (2016) effectuées ont permis de confirmer que la kindline-2 est exprimée par les cellules HIEC. De plus, j'ai dénoté que l'adhésion de ces cellules sur la fibronectine exogène stimule le recrutement de cette protéine et de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans les FAs marqués par l'ILK chez ces cellules. Cependant, l'inhibition de l'expression de l'ILK n'empêche pas le recrutement de la kindline-2 dans les FAs des cellules HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène (données préliminaires qui ne sont pas présentés dans les résultats).

En deuxième lieu, il est également possible que le recrutement du complexe PIP vers les intégrines soit important afin de réguler correctement l'architecture moléculaire des sites d'adhésion cellule-MEC et que cela affecte les interactions fonctionnelles entre les intégrines et la fibronectine dans ces sites. Ce mécanisme est avant tout suggéré par une étude de Patla et coll. (2010) qui mentionne succinctement que le recrutement de l'ILK aux intégrines module l'empaquetage moléculaire des sites d'adhésion cellule-MEC (Patla et al., 2010). Or, il est connu que la géométrie interne des agrégats de complexe intégrine-ligand est centrale pour la valence des intégrines, c'est-à-dire pour leur capacité à engager un nombre optimal de liaisons avec leur ligand (Carman and Springer, 2003). L'espacement latéral des structures internes de l'axe MEC-intégrine-actine est en outre guidé par la disposition de la séquence RGD dans le substrat d'adhésion et c'est la concordance entre cette disposition et l'espacement latéral des récepteurs intégrines qui ultimement permet la formation des fibres de stress ventrales parallèles et la

maturation des FAs (Cavalcanti-Adam et al., 2007; de Beer et al., 2010; Maheshwari et al., 2000; Patla et al., 2010). Or, les altérations aux fonctions cellulaires rapportées par plusieurs travaux de recherches étudiant les effets d'une organisation inappropriée de la séquence RGD dans le substrat d'adhésion (Cavalcanti-Adam et al., 2007; de Beer et al., 2010; Maheshwari et al., 2000) sont de façons générales comparables aux effets de l'inhibition de l'ILK chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. Par exemple, à l'image de nos observations chez ces dernières, une étude effectuée par Lutz et coll. (2011) rapporte qu'un espacement inadéquat du peptide RGD inhibe le phénotype contractile des fibroblastes en culture. Qui plus est, cette inhibition est associée chez ces mêmes cellules avec une réduction marquée de la formation des FBs et des fibrilles de fibronectines, ainsi qu'avec le blocage de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans les structures d'adhésion cellules-MEC immatures (Lutz et al., 2011). Ainsi, selon ce deuxième mécanisme que nous proposons, l'adhésion des cellules HIEC siILK sur la fibronectine exogène serait suffisante pour rétablir la valence des liaisons engagées entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine en condition d'inhibition de l'ILK.

#### 4.5 *L'ILK régule l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC indirectement par les effets stimulants de la fibronectine sur la voie RhoA/ROCK*

Il est typiquement considéré que les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'axe intégrine-actine sont en bonne partie dictées par l'influence des propriétés biomécaniques et biochimiques de la MEC sur les voies de signalisation régulées par les interactions intégrine-ligand (Parsons et al., 2010; Reinhart-King, 2011; Schwartz, 2010). Par exemple, il est connu que l'engagement de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  ou de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  suffit pour inhiber l'activité de RhoA lors des phases précoces de l'étalement des cellules épithéliales et fibroblastiques. Cependant, seule l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  — possiblement en coopération avec les effets de la tension locale sur l'activité des SFK et des GEF de RhoA (p. ex. p115RhoGEF et p190RhoGEF) — conduit à une activation forte et soutenue de RhoA lors des phases plus tardives de l'étalement (Danen et al., 2002; Huveneers and Danen, 2009; Morgan et al., 2009). De même, il est rapporté que la transition mécanodépendante du complexe  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine vers sa forme plus stable et adhésive maximise l'autophosphorylation du résidu tyrosine Y397 de FAK qui est entre autres impliqué dans la formation du complexe Src-FAK (Friedland et al., 2009). À l'opposé,

l'intégrine  $\alpha\beta3$  est habituellement responsable de la stimulation des fonctions de Src menant à l'activation des GEF de Rac1 et de Cdc42 (p. ex.  $\beta$ -pix, Dock180-ELMO1), ainsi qu'à l'inhibition de RhoA par p190RhoGAP (Huveneers and Danen, 2009; Morgan et al., 2009).

Nos résultats montrent pour leur part que les fonctions de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine dans l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire sont cruciales pour permettre à la MEC d'induire l'organisation contractile RhoA-dépendante habituelle de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC (caractérisée par la présence de fibres de stress ventrales parallèles, de FAs matures et de FBs). En effet, les cellules HIEC siILK sur une surface N.R. présentent une organisation précontractile de l'axe intégrine-actine typique de la fin de la phase isotropique de l'étalement cellulaire (Xiong et al., 2010; Zemel et al., 2010). Rappelons à ce propos, que malgré l'activité réduite de la voie RhoA en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK, nous avons montré que dans cette condition les fonctions de la MLCK suffisent pour induire l'élaboration des FAs immatures, des fibres dorsales et des arcs transverses. Puis, tel que nous l'avons mentionné précédemment, nos données indiquent que l'ILK ne possède pas de fonctions signalétiques intracellulaires déterminantes envers la voie RhoA/ROCK chez les cellules HIEC. Ainsi, le rétablissement des structures de l'axe intégrine-actine représentatives du phénotype contractile chez les cellules HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène est selon toute vraisemblance dû à la restauration du processus de fibrillogénèse de la fibronectine dans ces conditions. Dans ce cas, les interactions initiales des intégrines avec la matrice de fibronectine fibrillaire induiraient les mécanismes responsables de la stimulation optimale de l'activité de la voie RhoA/ROCK. Cette stimulation serait en parallèle associée avec la transition vers l'organisation contractile de cet axe lors du processus de l'étalement anisotropique des cellules HIEC (Danen et al., 2002; Scott et al., 2015). En plus de la participation plausible du complexe  $\alpha5\beta1$ -fibronectine dans la signalisation procontractile, l'activation de la voie RhoA/ROCK par la fibronectine chez les CEIs dépend probablement également de la contribution signalétique d'autres types d'intégrines (Benoit et al., 2009; Groulx et al., 2011). Les travaux de Benoit et coll. (2009) dans le laboratoire du Pr Beaulieu ont notamment établi que l'adhésion RGD-dépendante des cellules HIEC par l'intégrine  $\alpha8\beta1$  contribue à l'activation de la voie RhoA/ROCK, ainsi qu'à l'intégrité de l'organisation de l'axe intégrine-actine de ces cellules (Benoit et al., 2009).



Dans un tel contexte, comment réconcilier ces dernières conclusions avec l'épistémè actuelle concernant l'ILK qui considère cette protéine comme étant un élément important de la transduction et de l'intégration des voies de signalisation cellulaire de type *outside-in* stimulées par les intégrines (Cortez et al., 2011; Hannigan et al., 2011; Wickstrom et al., 2010b; Widmaier et al., 2012). Évidemment, il est possible que des distinctions fonctionnelles entre les CEIs et les autres types cellulaires puissent expliquer ces divergences. Toutefois, dans le cas particulier des fonctions signalétiques intracellulaires attribuées à l'ILK dans la régulation de l'activité de RhoA et/ou de l'organisation de l'axe intégrine-actine, il est important de considérer qu'au cours des années de nombreuses études ont été effectuées en envisageant cette protéine comme une véritable sérine/thréonine kinase ou en ne tenant pas compte de son rôle déjà connu envers la fibronectine. Par exemple, j'ai répertorié au moins deux situations où à l'occasion d'une publication des auteurs ont suggéré que des fonctions signalétiques directes de l'ILK puissent expliquer la participation de l'ILK dans la régulation de l'activité de RhoA (Maier et al., 2008; Vouret-Craviari et al., 2004). Puis, lors de publication ultérieure par les mêmes équipes de recherches, se sont ravisés pour ultimement concéder ces fonctions aux effets découlant du rôle de l'ILK dans l'assemblage de la fibronectine (Cseh et al., 2010; Lutz et al., 2010). Il est donc plus que possible qu'à d'autres occasions les effets fibronectine-dépendants de l'ILK aient été confondus pour des fonctions signalétiques intracellulaires de cette protéine.

Néanmoins, nos observations en immunofluorescence chez les cellules HIEC siILK suggèrent que certaines fonctions signalétiques intracellulaires plus subtiles de l'ILK pourraient être impliquées dans la régulation de l'organisation locale des réseaux sous-corticaux de filaments d'actine. En effet, nous avons constaté que les cellules HIEC siILK qui adhèrent sur la fibronectine exogène ou qui sont traitées avec l'inhibiteur pharmacologique PP2 de l'activité des SFK, présentent souvent des protrusions membranaires atypiques, de même qu'une organisation anormale de leur réseau d'actine sous-membranaire périphérique. Or, les cellules HIEC siILK cultivées sur la fibronectine exogène présentent une légère augmentation des niveaux membranaires actifs de Cdc42. De plus, une tendance similaire, mais qui s'est avérée statistiquement non significative a également été détectée dans les mêmes conditions pour les niveaux membranaires de Rac1. Cela soulève donc la possibilité que l'utilisation d'une technique plus sensible — tel que les essais basés sur le *pull-down* de la forme active liée au GTP des Rho GTPases (Knaus et al., 2007) — nous aurait permis de confirmer cette légère augmentation de

l'activité de Rac1. Ainsi, lors de travaux ultérieurs il serait intéressant d'étudier l'implication du complexe PIP et de la fibronectine dans la régulation de l'activité de Cdc42 et de Rac1 chez les HIEC en culture normale avec cette technique. Cela permettrait de vérifier si un tel rôle est impliqué dans la régulation locale de l'organisation des réseaux sous-corticaux de filaments d'actine et des protrusions membranaires telles que les filopodes et les lamellipodes. Dans le même ordre d'idée, il est pertinent de souligner que plusieurs interactions du complexe PIP ont précédemment été décrites pour participer directement à la régulation de la dynamique des réseaux de microfilaments d'actine, et ce, chez une variété de modèles et de types cellulaires (Boulter et al., 2006; Legate et al., 2006). Mentionnons par exemple que les interactions directes ou indirectes (via l' $\alpha$ -actinine et la protéine *paxilline kinase linker* (PKL)) des membres des parvines peuvent permettre de recruter et de réguler les GEF  $\alpha$ -pix et  $\beta$ -pix, de même que la GAP cdGAP au niveau des FAs, et ce, afin de moduler l'activité de Rac1 et/ou de Cdc42 (Boulter et al., 2006; LaLonde et al., 2006; Pignatelli et al., 2012; Rosenberger et al., 2003; Wormer et al., 2012; Yamaji et al., 2004). Il a également été démontré que les interactions de PINCH-1 peuvent permettre au complexe PIP d'engager la protéine adaptatrice Nck-2 (Legate et al., 2006). Cette dernière étant entre autres impliquée dans le recrutement de la protéine Wasp afin que le complexe Arp2/3 puisse médier le branchement orthogonal des faisceaux d'actine-F sous-membranaire lors de la formation des lamellipodes (Jaffe and Hall, 2005). Notons de plus que la protéine adaptatrice Nck-2 est également connue pour s'associer avec la GEF de Rac1 nommée Dock180. Finalement, Dock180 et l'ILK peuvent se complexer avec les protéines ELMO1/2. Or, dans ce contexte, cette dernière est impliquée dans le recrutement de RhoG afin de réguler l'organisation du cytosquelette d'actine par l'activation de Rac1 (Ho et al., 2009; Katoh et al., 2006; Katoh and Negishi, 2003).

Autrement, les interactions du complexe PIP chez les CEIs pourraient également moduler les processus d'assemblage et de désassemblage des faisceaux sous-corticaux d'actine-F. Par exemple, il est possible que la séquestration de la thymosine- $\beta$ 4 par PINCH-1 puisse moduler la disponibilité locale des monomères d'actine-G servant à l'élaboration des faisceaux de microfilaments d'actine (Legate et al., 2006). Il est également possible que les effets de l'adhésion à la fibronectine sur les interactions du complexe PIP et de ses membres individuelles puissent réguler les niveaux de <sup>pS3</sup>cofiline afin de contrôler la stabilité des faisceaux sous-corticaux d'actine-F des CEIs. Ce processus pourrait impliquer par exemple la contribution du

complexe Src-ILK (Kim et al., 2008), la régulation de la voie Cdc42/PAK/LIM-K/cofiline par les interactions de PAK1 avec le complexe ILK/parvine/ $\beta$ -PIX (Pignatelli et al., 2012; Shibue et al., 2013) ou encore, l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline par l'association de l' $\alpha$ -parvine avec la kinase TESK1 (LaLonde et al., 2005).

Dans un autre ordre d'idées, les données préliminaires provenant de l'analyse des conséquences de l'inhibition pharmacologique des SFK, de la PI3-K et des MAPK MEK et p38 sur le cytosquelette d'actine des cellules HIEC révèlent que chacune de ces kinases est impliquée dans la régulation de l'organisation de l'axe intégrine-actine des CEIs. En somme, ces données indiquent que chez les cellules HIEC les fonctions des SFK et des kinases PI3-K sont respectivement importantes pour la formation des différents types de fibres de stress et pour la régulation des fibres de stress ventrales. À l'inverse, les kinases p38 et MEK inhibent le développement des fibres de stress ventrales. Nos données indiquent également que les fonctions des SFK contribuent au développement des fibres de stress ventrales — au moins en partie — en permettant de réguler négativement l'action des kinases p38 et des kinases MEK.

Le rôle du complexe Src-FAK et de la PI3-K dans la régulation directe et/ou indirecte des membres des kinases MEK et p38 a déjà été démontré dans le contexte de l'étude de l'anoïkose chez les cellules HIEC par le laboratoire du Pr Vachon (Beausejour et al., 2012; Bouchard et al., 2008). Or, ces mêmes voies de signalisation peuvent contribuer de plusieurs façons différentes à la régulation des caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'axe intégrine-actine des CEIs. Par exemple, le complexe Src-FAK a été décrit pour induire le démantèlement des FAs chez les fibroblastes embryonnaires de souris en migration par un mécanisme impliquant la paxilline, la voie MEK/ERK et la MLCK (Webb et al., 2004). Puis, il est rapporté que la voie MEK/ERK stimule l'activité de la MLCK et la migration cellulaire (Klemke et al., 1997). Enfin, l'activation de la voie MEK/ERK inhibe les fonctions de ROCK et la formation des fibres de stress et des FAs chez les cellules endothéliales et fibroblastiques (Mavria et al., 2006; Pawlak and Helfman, 2002). D'autre part, les kinases p38 sont des cibles directes et indirectes (via PAK-1) de Rac1 et Cdc42. Dans ce cas, elles agissent comme des protéines effectrices de ces deux Rho GTPases lors des étapes précoces du processus d'adhésion/étalement de différents types de modèles cellulaires (p. ex. CEI, fibroblaste) (Cargnello and Roux, 2011; Dobrev et al., 2006; Frey et al., 2004; Zhang et al., 1995). Finalement, les kinases p38 peuvent phosphoryler et réguler les fonctions de la protéine Hsp-27 qui est impliquée dans le contrôle de la polymérisation de

l'actine-F lors de la formation des lamellipodes et des protrusions membranaires de type « *blebbing* » (Huot et al., 1998; Pichon et al., 2004). Évidemment, la contribution de l'un ou l'autre de ces mécanismes dans la régulation de l'organisation de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC demeure spéculative. Néanmoins, ces exemples illustrent bien la variété des mécanismes pouvant potentiellement impliquer les kinases Src, PI3-K, MEK et p38 dans le contrôle de l'organisation de l'axe intégrine-actine.

Dans la même optique, le fait que les kinases p38 soient rapportées pour être centrales dans les étapes précoces du processus d'adhésion/étalement s'accorde avec les résultats que nous avons obtenus lors de l'inhibition pharmacologique combinée des SFK (par le PP2) et des kinases p38 (par le SB203580). En effet, nos données indiquent que lorsque l'activité des SFK est inhibée, l'activité des kinases p38 permet de bloquer la formation des fibres de stress ventrales chez les cellules HIEC qui s'étalent sur une surface N.R., mais non chez les cellules HIEC sur la fibronectine exogène. Cela suggère par le fait même que le processus de déposition/assemblage de la fibronectine lors des phases plus tardives de l'étalement des cellules HIEC est important dans l'inhibition des fonctions anticontractiles des kinases p38 par les SFK. Cette interprétation de nos résultats concorde d'ailleurs avec les travaux de Zhang et coll. (2003) qui ont démontrés que l'adhésion sur la fibronectine bloque l'activation de p38 chez les cellules Caco-2 (Zhang et al., 2003b). Ainsi, le rôle de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine pour l'assemblage de la fibronectine endogène soluble contribue plausiblement à l'inhibition des fonctions anticontractiles des kinases p38 lors des phases tardives de l'étalement des cellules HIEC. Cela propose donc que la stimulation des fonctions des SFK par les interactions des intégrines avec la fibronectine de la MEC conduit à l'inhibition des kinases p38 et que ce mécanisme signalétique puisse autoriser l'élaboration des fibres de stress ventrales lors de la transition vers la phase anisotrope de l'étalement des cellules HIEC. Toutefois, d'autres mécanismes et voies de signalisation sont sans aucun doute impliqués dans cette transition puisque les cellules HIEC siILK déjà étalées sur une surface N.R et traitées uniquement avec l'inhibiteur des kinases p38 conservent un étalement incomplet. D'autre part, les effets réhabilitants du substrat de fibronectine exogène sur la contractilité et l'étalement des cellules HIEC siILK tendent à démontrer que l'inhibition de l'expression de l'ILK n'aurait pas d'impact significatif sur les voies de signalisation contrôlant l'organisation contractile de l'axe intégrine-actine des cellules HIEC en dehors des effets fibronectine-dépendants de cette inhibition sur ces

mêmes voies. D'ailleurs, en ce sens, une étude chez les cellules épithéliales mammaires MCF10A a récemment confirmé que — contrairement à ce qui avait été avancé au préalable — les interactions entre la protéine Rsu1 et PINCH-1 dans le complexe PIP ne seraient pas impliquées dans la régulation du rôle connue de Rsu1 dans la stimulation de p38 et de Rac1 lors de l'étalement et de la migration cellulaire (Gonzalez-Nieves et al., 2013).

Finalement, en dépit du fait que selon les dernières indications l'ILK ne peut être phosphorylée par la PI3-K (Fukuda et al., 2009), plusieurs études chez les CEIs démontrent que l'activité de la PI3-K est cruciale pour le recrutement et les fonctions de l'ILK dans les FAs (Camacho-Leal et al., 2007; Delcommenne et al., 1998; Yuan et al., 2011). Camacho-Leal et coll. (2007) ont notamment suggérés à ce propos qu'une boucle de rétroactions positives entre l'agrégation des intégrines, la stimulation de la PI3-K et le recrutement de l'ILK aux intégrines serait importante pour permettre l'activation rapide et soutenue des intégrines (Camacho-Leal et al., 2007). Sous cet angle, les effets de l'inhibition pharmacologique de la PI3-K (par le LY294002) que nous avons observés chez les cellules HIEC suggèrent que la fibronectine stimule des fonctions de la PI3-K servant à induire le développement des fibres de stress ventrales parallèles à partir des fibres dorsales et des arcs transverses préexistants. Considérant de plus qu'il a déjà été démontré que les fonctions de la PI3-K contribuent — avec celles de Src — à induire l'initiation du processus de fibrillogénèse de la fibronectine chez le modèle cellulaire fibroblastique SYF (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2002). Il serait très intéressant de vérifier si la PI3-K régule la distribution cellulaire de l'ILK et du complexe PIP afin de contrôler l'assemblage de la fibronectine soluble en matrice fibrillaire chez les CEIs indifférenciées en culture.

#### *4.6 L'influence principale de l'ILK sur les fonctions des CEIs en culture dépend de son rôle pour la fibrillogénèse de la fibronectine*

L'importance des interactions cellulaires avec la fibronectine dans la régulation des principaux processus et fonctions cellulaires (p. ex. prolifération, adhésion/étalement, migration) est connue depuis longtemps (Danen and Yamada, 2001; Hocking et al., 2000; Sottile and Hocking, 2002; Sottile et al., 2000; Sottile et al., 1998). Puis, les effets mécanodépendants (p. ex. stimulation de la voie RhoA/ROCK, assemblage des fibres de stress, étalement complet) qui sont associés à

l'adhésion des cellules sur une MEC suffisamment rigide sont maintenant connus pour induire la translocation nucléaire du facteur de transcription *megakarioblastic leukemia 1* (MKL1) et des deux coactivateurs homologues de la transcription *Yes-associated protein* (YAP) et *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ). Ces protéines contrôlent ensuite la transcription de nombreux gènes (p. ex. CTGF/CCN2, fibronectine, actine) impliqués dans la réponse des fonctions cellulaires face à la rigidité de la MEC (Hao et al., 2014; Janmey et al., 2013). Pour notre part, nous avons montré que malgré l'inhibition de l'expression de l'ILK, l'étalement, la migration et la prolifération des CEIs en culture sont secourues lorsque les CEIs traitées avec le siILK adhèrent à un substrat de fibronectine exogène permettant le rétablissement du processus de fibrillogénèse. Sous cet angle, l'impact négatif de l'inhibition de l'expression de l'ILK sur ces mêmes fonctions concorde avec les effets plausibles de l'altération des propriétés mécaniques de la MEC et des interactions des cellules avec la fibronectine. À la lumière de ces informations et de celles dont nous avons précédemment discuté, nous proposons que l'inhibition de l'expression de l'ILK affecte l'étalement, la migration et la prolifération des CEIs en culture essentiellement par ses effets sur les processus et mécanismes contrôlés par la fibronectine et la rigidité de la MEC. Par conséquent, nous proposons également que le rôle de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine dans le processus d'assemblage de la fibronectine endogène soluble en matrice fibrillaire représente la principale contribution de l'ILK dans la régulation des fonctions des CEIs.

Par exemple, tel que nous en avons discuté dans la section précédente (4.5), la phase anisotrope du processus d'adhésion/étalement dépend des mécanismes RhoA-dépendants qui sont stimulés par l'adhésion sur la fibronectine (Danen et al., 2002; Dubin-Thaler et al., 2004; Scott et al., 2015; Zemel et al., 2010). Ainsi, cela expliquerait pourquoi les cellules HIEC siILK sur une surface N.R. — qui présentent une baisse substantielle des niveaux de RhoA membranaire actifs — conservent une aire d'étalement incomplète et arrondie qui est caractéristique de la phase isotrope du processus d'étalement. Puis, nous avons dénoté que le ralentissement de la migration des cellules HIEC siILK sur une surface N.R. est associé avec l'adoption d'un mode de migration de type protrusif. Ce mode est typiquement Rac1-dépendant et exécuté sur un substrat soutenant peu l'adhésion cellulaire par les intégrines (Friedl and Wolf, 2010). Dans ce cas, des essais basés sur le *pull-down* de la forme active liée au GTP des Rho GTPases (Knaus et al., 2007) nous permettrait vraisemblablement de vérifier si le changement du

mode de migration des cellules HIEC siILK dépend de l'inhibition de RhoA et de l'activation Rac1. Néanmoins, le rôle de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine pour l'assemblage de la fibronectine fibrillaire est vraisemblablement nécessaire afin que les qualités biomécaniques de la MEC (rigidité vs élasticité) et/ou la stabilité des interactions adhésives cellule-MEC puissent soutenir l'activation normale de RhoA et leur mode habituel de migration de type contractile (Friedl and Wolf, 2010). Puisque la stabilité des interactions cellules-MEC est habituellement proportionnelle à la densité des complexes intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine stables formés (Friedland et al., 2009; Roca-Cusachs et al., 2009). Cela soutient donc notre hypothèse selon laquelle l'expression de l'ILK serait importante pour l'intégrité des interactions de ce complexe intégrine-ligand.

La rétablissement de l'indice prolifératif des cellules HIEC siILK et Caco-2/15 siILK sur la fibronectine exogène est également compatible avec les effets de la fibronectine sur la prolifération (Danen and Yamada, 2001; Sottile et al., 1998). De plus, la littérature démontre que la rigidité de la MEC et ses effets cellulaires procontractiles (p. ex. stimulation de la voie RhoA/ROCK) peuvent stimuler la progression du cycle cellulaire par différents mécanismes permettant l'élévation des niveaux de la cycline D1 et une baisse de ceux de la protéine p27<sup>KIP1</sup> (Croft and Olson, 2006; Heng and Koh, 2010; Janmey et al., 2013; New and Wong, 2007; Roovers and Assoian, 2006). Ainsi, la réduction substantielle de l'activité de la voie RhoA/ROCK chez les cellules HIEC siILK cultivées sur une surface N.R. est compatible avec la diminution de la cycline D1 et la hausse des niveaux de p27 qui sont associées à la baisse de l'indice prolifératif de ces cellules.

Bien que le substrat de fibronectine exogène ait permis de rétablir l'indice prolifératif des cellules HIEC siILK au niveau des cellules HIEC siCNS sur une surface N.R., cet indice est demeuré statistiquement inférieur à celui des cellules HIEC siCNS sur la fibronectine exogène. Une explication possible dans ce cas est que l'organisation légèrement différente de la MEC de fibronectine assemblée par les cellules HIEC siILK sur la fibronectine nuise aux effets prolifératifs des facteurs de croissance associés avec la MEC (Zhu and Clark, 2014). Cependant, contrairement à ce que nous avons observé chez les cellules HIEC, l'adhésion sur la fibronectine exogène n'a pas stimulé davantage la prolifération des cellules Caco-2/15 siCNS, mais a permis de rétablir complètement l'indice prolifératif des cellules Caco-2/15 siILK. Or, à l'opposé du profil d'expression génomique du modèle normale de CEI proliférative HIEC qui se compare à

celui des CEIs prolifératives de la crypte, celui des cellules Caco-2/15 prolifératives présente des caractéristiques qui sont habituellement associées au CRC (Tremblay et al., 2006). Qui plus est, il est bien établi que les cellules Caco-2 possèdent des mutations au niveau de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (p. ex. APC,  $\beta$ -caténine et p53) (Ahmed et al., 2013; Djelloul et al., 1997; Ilyas et al., 1997). Ainsi, les variations des effets du substrat de fibronectine exogène sur la prolifération des cellules HIEC et Caco-2/15 dans les conditions contrôles et d'inhibition de l'expression de l'ILK résultent vraisemblablement des différences entre les modes « normal » et « cancéreux » respectifs de régulation du cycle cellulaire de ces deux modèles de CEI.

Dans le même ordre d'idée, puisque l'indice prolifératif des cellules HIEC siILK n'est pas complètement secouru par le substrat de fibronectine exogène, cela suggère que des fonctions de l'ILK indépendantes du rôle du complexe PIP dans la fibrillogénèse de la fibronectine pourraient également contribuer à la progression du cycle cellulaire des CEIs normales. Dans ce cas, il est entre autres possible que l'expression de l'ILK et du complexe PIP puisse favoriser la prolifération des CEIs normales en permettant aux interactions entre les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance (p. ex.  $\alpha 5 \beta 1$ /EGFR) d'activer optimalement les voies de signalisation responsables de stimuler la progression du cycle cellulaire (p. ex. Ras/MEK/ERK) (Kuwada and Li, 2000; Lee and Juliano, 2002). En effet, il a été suggéré que la liaison de PINCH-1 avec la protéine adaptatrice NCK-2 permet au complexe PIP de former un lien fonctionnel entre les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance (Legate et al., 2006; Vaynberg et al., 2005; Velyvis et al., 2003). Puis, le complexe PIP a été identifié chez une variété de types cellulaires pour contribuer à la signalisation promototique médiée par ce type de récepteur (Eke et al., 2006; Esfandiarei et al., 2010; Fuchs et al., 2008; Liu et al., 2008; Rosano et al., 2006; Xie et al., 2013). Autrement, ces fonctions pourraient être indépendantes de l'hétérotrimère PIP et impliquer les sous-populations nucléaires et centrosomiques de l'ILK qui ont respectivement été identifiées pour stimuler la synthèse de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) (Nakrieko et al., 2008a) et pour contribuer à la formation du fuseau mitotique (phase G2/M) (Fielding et al., 2011). De façon intéressante, ces fonctions moins connues de l'ILK participent à des phases différentes du cycle cellulaire que celle de la fibronectine dans la progression de la phase G1 (Danen and Yamada, 2001). Des analyses comparatives en cytométrie laser de la répartition des cellules HIEC siCNS et HIEC siILK entre les phases G1, S



et G2/M du cycle cellulaire en fonction du substrat d'adhésion (N.R. vs FN) permettraient donc en principe de vérifier rapidement si ces deux sous-populations hors PIP de l'ILK contribuent potentiellement à la progression du cycle cellulaire des cellules HIEC.

Par ailleurs, l'ILK a précédemment été décrite chez les CEIs et chez d'autres types cellulaires pour stimuler la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et pour contribuer à l'activation de la voie Wnt de différentes façons (Dobrev et al., 2008; Hannigan et al., 2005; Oloumi et al., 2010; Oloumi et al., 2004; Oloumi et al., 2006). Par exemple, un complexe formé entre l'ILK et la protéine dishevelled (Dvl) est rapporté pour induire la voie Wnt chez des cellules de muscles lisses (Perez et al., 2011; Torres and Nelson, 2000). Néanmoins, les résultats obtenus lors de nos essais luciférase TOPflash/FOPflash indiquent que cette voie est naturellement très peu active chez les cellules HIEC natives, ce qui a d'ailleurs ultérieurement été confirmé par les travaux de Guezguez et coll. effectués dans le laboratoire du Pr Beaulieu (Guezguez et al., 2014). Nos résultats révèlent également que l'inhibition de l'expression de l'ILK stimule l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF lorsque les cellules HIEC expriment la  $\beta$ -caténine de façon exogène. Cet effet répressif de l'ILK a également été observé chez des cellules HIEC exprimant la forme mutée  $\beta$ caténine-mut<sup>S37A</sup> qui est résistante à la phosphorylation de la kinase GSK-3 dirigeant la  $\beta$ -caténine vers les voies du protéasome (Morin et al., 1997; Young et al., 1998). Du coup, cela suggère que les mécanismes impliquant l'ILK comme inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine chez les cellules HIEC s'exercent indépendamment des effets du système ubiquitine-protéasome sur la dégradation de cette protéine. À la lumière de ces résultats, il semble donc improbable que l'expression de l'ILK stimule le cycle cellulaire des CEIs normales et indifférenciées en culture par l'entremise de l'activation de la voie Wnt et de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine. L'existence de telles fonctions inhibitrices de l'ILK dans un contexte épithélial normal s'accorde d'ailleurs avec les travaux de Judah et coll. (2012) montrant que la réexpression de l'ILK inhibe la transcription des gènes ciblés par la voie Wnt chez les kératinocytes murins normaux en culture (Judah et al., 2012). Une hypothèse à considérer pour expliquer cet effet particulier de l'expression de l'ILK chez les cellules HIEC est que l'ILK et la  $\beta$ -caténine soient impliquées au sein d'un complexe protéique commun permettant de séquestrer la  $\beta$ -caténine hors du noyau. En effet, de façon intrigante nous avons pu détecter l'ILK par immunobuvardage dans un immunoprécipité de la  $\beta$ -caténine lors d'une expérience préliminaire (données non présentées). Selon cette dernière

hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'implication potentielle de la protéine d'échafaudage IQGAP1 puisque cette protéine est considérée comme centrale dans le contrôle de la compartimentalisation fonctionnelle de la  $\beta$ -caténine et qu'elle peut s'associer avec l'ILK dans le contexte de l'axe intégrine-microtubule (Akhtar and Streuli, 2013; Noritake et al., 2005; Wickstrom et al., 2010a).

Mentionnons en terminant que les effets réhabilitants de l'adhésion sur la fibronectine exogène sur les altérations causées par l'inhibition de l'expression de l'ILK chez les CEIs en culture constituent plutôt l'exception que la règle. En effet, la littérature fournit de nombreux exemples démontrant que chez d'autres types de modèle cellulaire l'adhésion sur la fibronectine exogène n'est pas suffisante afin de secourir les fonctions putatives de l'ILK (Stanchi et al., 2009; Vouret-Craviari et al., 2004). Évidemment, le répertoire spécifique des intégrines et des corécepteurs (p. ex. syndécan, uPar) de la fibronectine ou encore des autres constituants de la MEC (p. ex. collagènes, laminines) qui est exprimé par les CEIs pourrait contribuer à expliquer cette situation (Singh et al., 2010; Xu et al., 2009). Toutefois, nos résultats chez les CEIs en culture indiquent clairement que comparativement aux autres types cellulaires, c'est le rétablissement de l'assemblage de la matrice de fibronectine fibrillaire insoluble permit par l'adhésion sur la fibronectine exogène qui est l'élément déterminant à considérer afin d'expliquer les effets réhabilitants de ce substrat d'adhésion de remplacement en condition d'inhibition d'expression de l'ILK.

#### *4.7 L'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine permet aux CEIs d'assembler et déposer la matrice de fibronectine fibrillaire dans la lame basale de la muqueuse intestinale*

Les caractéristiques de la distribution de l'ILK, PINCH-1 et des parvines à la base de la membrane basolatérale des CEIs de l'épithélium intestinal humain (fœtale et adulte) sont en ligne avec nos résultats chez les modèles de CEI humaine. Cela tend donc à démontrer que le complexe PIP colocalise avec les intégrines dans les sites d'adhésion des CEIs à la lame basale de la muqueuse intestinale. Plus précisément, nos observations en immunofluorescence dans l'intestin adulte indiquent que l'expression de l'ILK, PINCH-1, et des parvines à la base du domaine membranaire basolatéral est prédominante chez les CEIs de la portion inférieure des cryptes, puis qu'elle régresse jusqu'à ce qu'elle devienne indétectable chez les CEIs post-

mitotiques et différenciées des villosités. Or, il existe une corrélation spatio-temporelle directe entre la distribution du complexe PIP, celle des récepteurs intégrines de la fibronectine à la base des CEIs de l'axe crypte-villosité et celle de la fibronectine dans la lame basale sous-jacente. Ainsi, tel que nous l'avons décrit pour les membres du complexe PIP, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et l'intégrine  $\alpha 8 \beta 1$  sont principalement détectées selon un marquage irrégulier et ponctué à la base des CEIs du compartiment cryptal (Benoit et al., 2009; Lussier et al., 2000). Puis, la fibronectine est principalement détectée au niveau de la MEC (dont la lame basale) des cryptes intestinales (Beaulieu, 1992; Gagne et al., 2010; Laurie et al., 1982; Simon-Assmann et al., 1986). À cet égard, il est intéressant de souligner que le processus de répression (vers le tiers inférieur des villosités) de la distribution basale des membres du complexe PIP que nous avons dénoté chez les CEIs villositaires humaines lors du développement (de l'intestin fœtal à l'intestin adulte), se compare au processus de répression de la distribution de la fibronectine dans la MEC et la lame basale de l'axe crypte-villosité pendant la maturation de la muqueuse intestinale murine (Simon-Assmann et al., 1986). Prises ensemble, ces informations suggèrent que l'expression du complexe PIP chez les CEIs *in vivo* permet à ces cellules d'assembler et de déposer la fibronectine au niveau de la lame basale des cryptes. La MEC étant un matériel biologique dynamique constamment soumis à des processus de dégradation, de reconstruction et de réorganisation, une telle capacité des CEIs cryptales à assembler une matrice de fibronectine fibrillaire *de novo* est à l'évidence importante afin que ces cellules puissent moduler leurs interactions avec la lame basale intestinale au cours de leur progression dans les cryptes. Il est toutefois important de préciser que les myofibroblastes péricryptaux de la *lamina propria* participent également à l'expression et à l'assemblage de nombreux constituants de la lame basale, dont la fibronectine (Beaulieu, 1997; Mifflin et al., 2011).

Il est intéressant de faire un rapprochement entre ce rôle que nous suggérons pour l'ILK dans l'épithélium intestinal normal et ce que la littérature rapporte concernant les effets de la dérégulation de l'expression et/ou des fonctions de cette protéine chez les CEIs *in vivo* et *ex vivo*. D'abord, il est rapporté que l'expression d'une forme sauvage exogène de l'ILK chez des lignées clonales des cellules IEC-18 stimule la prolifération, le processus de transition épithélium-mésenchyme (EMT) et augmente le potentiel tumorigénique de ces cellules *in vivo* (Delcommenne et al., 1998; Novak et al., 1998; Radeva et al., 1997; Tan et al., 2001; Wu et al., 1998). Or, d'une part l'augmentation de la déposition de la fibronectine cellulaire est un

marqueur connu du processus EMT (White et al., 2007; Zeisberg and Neilson, 2009). D'autre part, tel que nos résultats l'indiquent, l'adhésion des CEIs à une MEC formée de fibronectine stimule la prolifération de ce type cellulaire. Par ailleurs, une expression anormalement élevée de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  chez les CEIs cancéreuses stimule l'adhésion sur la fibronectine et le potentiel invasif de ces cellules, ce qui contribue à faire progresser la carcinogenèse du CRC (Gong et al., 1997). Corollairement, des niveaux d'expressions anormalement élevés de l'ILK au niveau de l'épithélium intestinal humain ont également été associés avec la progression de la carcinogenèse du CRC (Bravou et al., 2003; Guebel et al., 2012; Marotta et al., 2003). Remarquablement, Assi et coll. (2008, 2011) ont démontré à l'inverse que le *knock-out* conditionnel (mais incomplet) de l'expression de l'ILK dans l'épithélium intestinal de souris protège partiellement la muqueuse intestinale de ces dernières contre la formation de lésions fibreuses et la transformation néoplasique de l'épithélium (Assi et al., 2008; Assi et al., 2011). Ces auteurs suggèrent que les effets protecteurs de l'inhibition de l'expression de l'ILK seraient médiés au moins en partie par la réduction de l'expression et de la déposition de la fibronectine par les CEIs dans ces conditions. Ainsi, de façon générale les effets pro- et anti-tumorigéniques des variations de l'expression de l'ILK chez les CEIs *in vivo* et/ou *ex vivo* semblent directement associées avec l'impact de ces variations sur l'activité de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine. Donc, avec l'influence de cet axe sur le comportement des CEIs. Par conséquent, ces informations soutiennent clairement que les fonctions de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine soient également impliquées dans le contrôle des processus et des prises de décision cellulaire chez les CEIs normales de la muqueuse intestinale saine.

#### 4.8 *L'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine peut participer par différents mécanismes au contrôle du comportement des CEIs in vivo*

Il est de plus en plus reconnu que les propriétés biomécaniques de l'environnement cellulaire — et plus particulièrement les caractéristiques d'élasticités et de rigidités de la MEC qui dépendent en bonne partie du réseau de fibronectine fibrillaire — participent à de multiples niveaux dans la mise en place et le maintien de l'homéostasie des épithéliums et des tissus en générales (Kim et al., 2010a; Mammoto and Ingber, 2010). Par exemple, la rigidité de la MEC régule positivement la sensibilité des récepteurs de facteurs de croissance impliqués dans la stimulation du cycle

cellulaire chez les cellules épithéliales (Kim and Asthagiri, 2011). Puis, tel que nos expériences le suggère, il est rapporté que le développement de la tension isométrique le long de l'axe MEC-intégrine-actine est essentiel afin d'induire de façon optimale les voies de mécanotransductions stimulant la prolifération et la migration des CEIs en culture (Gayer and Basson, 2009). En ce sens, la contribution de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine pour les propriétés biomécaniques et biochimiques spécifiques de la lame basale et de l'environnement cellulaire des cryptes (Buske et al., 2012) est selon toute vraisemblance cruciale afin de réguler correctement les comportements cellulaires tels que la migration et la prolifération chez les CEIs progressant le long des cryptes intestinales. À l'opposé, la diminution à proximité de l'interface crypte/villosité de la distribution basale du complexe PIP chez les CEIs et de la fibronectine dans la lame basale sous-jacente est plausiblement associée avec la répression de la prolifération chez les CEIs qui achèvent leur processus de différenciation terminale.

Dans le cas particulier de la migration, il est important de considérer que le contexte à l'intérieure de la monocouche formant le feuillet épithélial de la muqueuse intestinale est très différent de celui de nos essais de migration. Plus précisément, la surface restreinte d'adhésion à la lame basale des CEIs prismatiques de la monocouche indique qu'elles ont des possibilités limitées d'effectuer le même type de migration active que celle présentée par les cellules HIEC (Heath, 1996; Petrie et al., 2009). Les données obtenues lors des essais de migration et d'étalement/migration des cellules HIEC suggèrent néanmoins que l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine contribue à promouvoir l'étalement et la migration lors du processus de restitution des CEIs en marge des blessures de l'épithélium intestinal. En ce sens, le ralentissement relativement modeste de la restitution des monocouches blessées de cellules Caco-2/15 siILK est compatible avec les effets modérés de la fibronectine dans le processus de restitution des cellules Caco-2/15 natives (Seltana et al., 2010). De plus, nous avons démontré que ce ralentissement est secouru en présence de fibronectine exogène (Gagne et al., 2010). Ces résultats chez les cellules Caco-2/15 ont d'ailleurs été corroborés par les résultats comparables d'une étude ultérieure de Yuan et coll. (2011) chez les cellules Caco-2 (Yuan et al., 2011). Ainsi, considérant que le processus EMT des CEIs stimule l'expression de l'ILK (Gil et al., 2011; Somasiri et al., 2001; Tan et al., 2001), il est raisonnable d'assumer que lors des étapes précoces de la restitution des CEIs villositaires, le processus de type EMT de dédifférenciation et de dépolarisation de ces cellules (Basson, 2001; Mammen and Matthews, 2003) provoque

vraisemblablement la réexpression du complexe PIP. Un tel mécanisme pourrait permettre aux CEIs villositaires de déposer rapidement la fibronectine sur la frange interne des blessures, et ce, afin d'optimiser l'étalement et la migration collective de ces cellules lors du processus de restitution.

Parallèlement, nos résultats chez les cellules Caco-2/15 indiquent que l'expression génétique des membres du complexe PIP est maintenue même aux stades les plus avancés de la différenciation entérocytaire et que le niveau de ces protéines est principalement régulé de façon post-traductionnel. Ainsi, la capacité des CEIs villositaires à réguler promptement les niveaux cellulaires des membres du complexe PIP par un processus post-traductionnel pourrait constituer un mécanisme adaptatif important dans le contexte très abrasif de la muqueuse intestinale où les blessures à la monocouche épithéliale sont normales et fréquentes. En effet, un tel mécanisme permettrait assurément de maximiser la dynamique de cloisonnement de la barrière épithéliale face au contenu luminal de l'intestin qui est riche en micro-organismes. Par comparaison, l'expression génétique de l'ILK et de PINCH cesse très rapidement chez les kératinocytes de la couche suprabasale de l'épiderme qui exécutent leur processus de différenciation terminale (Lorenz et al., 2007; Nakrieko et al., 2008b; Xie et al., 1998). Or, la charge de chacun des kératinocytes de l'épiderme (épithélium stratifié) est beaucoup moins importante que celle des CEIs de la muqueuse intestinale (épithélium simple) en ce qui a trait au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (Turner, 2006).

Nonobstant le fait que le processus de restitution épithéliale en lui-même ne requiert pas la prolifération des CEIs, plusieurs évidences provenant de l'étude *in situ* et *in silico* de la dynamique de l'épithélium intestinal, proposent que la pression mitotique induite par la division rapide des CEIs progénitrices de la demi-inférieure des cryptes constitue le principal moteur de la migration des CEIs à l'intérieur du feuillet épithélial de l'axe crypte-villosité (Heath, 1996; Meineke et al., 2001; Tsubouchi, 1983; Wong et al., 2010). À cet égard, puisque nous démontrons que le rôle de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine pour l'assemblage de la fibronectine soluble permet de stimuler la prolifération des CEIs, cet axe participe selon toute vraisemblance à induire la pression mitotique impliquée dans la progression des CEIs de la base des cryptes vers l'extrémité des villosités.

Tel que nous l'avons mentionnée précédemment, nos expériences indiquent que les fonctions de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine permettent de renforcer les propriétés

mécaniques de l'interface cellule/MEC des CEIs en culture. L'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine serait donc déterminant dans la régulation de l'adhésivité des CEIs de l'axe crypte-villosité à la lame basale sous-jacentes. Conformément à cette interprétation de nos résultats, Kim et coll. (2009, 2010) rapportent que la bactérie pathogène de l'intestin *Shigella flexneri* détourne les fonctions de l'ILK dans le but d'empêcher le détachement et l'élimination normale des CEIs infectées du feuillet épithélial. La protéine OspE exprimée par cette bactérie s'associe dans ce cas avec l'ILK afin de renforcer l'adhésivité intégrine-dépendante des CEIs à lame basale de l'axe crypte-villosité (Kim et al., 2009; Kim et al., 2010b). Or, certains modèles de migration des CEIs *in vivo* couplant la pression mitotique au principe de l'adhésion différentielle suggèrent que les variations de l'adhésivité des différents types de CEIs de l'axe crypte-villosité à la lame basale en fonction de leur état de différenciation soient un facteur primordial dans la coordination de la direction et de la vitesse de migration de ces cellules le long de cet axe (De Matteis et al., 2013; Ryan et al., 2001; Wong et al., 2010). Ainsi, les effets de la régulation de l'expression du complexe PIP sur l'adhésivité des CEIs de l'axe crypte-villosité pourraient moduler leur vitesse de migration face aux effets de la pression mitotique. Plus précisément, l'expression prédominante du complexe PIP chez les CEIs prolifératives et les quantités plus importantes de fibronectines dans la lame basale de la portion inférieure des cryptes pourrait — selon le principe de l'adhésion différentielle — limiter la progression des CEIs prolifératives vers les villosités. Dans un tel contexte, le gradient d'expression négatif du complexe PIP de la base des cryptes vers les villosités contribuerait au maintien de la bipartition physique entre le compartiment cryptal des CEIs prolifératives et le compartiment villositaire des CEIs post-mitotiques différenciées (Wong et al., 2010). Ce même gradient pourrait également servir à diriger et/ou maintenir les cellules de Paneth et les cellules souches au niveau de la base des cryptes (Wong et al., 2010). Dans cette optique, il est intéressant de souligner que les travaux d'Assi et coll. (2008) rapportent que des souris dont l'épithélium intestinal a subi un knock-out conditionnel de l'ILK présentent une réduction marquée de la hauteur des cryptes, et ce, même si le nombre total de CEIs dans l'axe crypte-villosité demeure constant (Assi et al., 2008). Or, cette réduction de l'étendue du compartiment cryptal est associée en parallèle avec une baisse substantielle de la fibronectine dans la MEC des lésions tumorigéniques induites par des agents carcinogènes. Par conséquent, selon notre hypothèse du rôle du complexe PIP dans l'adhésion différentielle des CEIs *in vivo*, il est tentant de spéculer que la diminution physique des cryptes

des souris *knock-out* pour l'ILK résulterait des effets de la baisse de la fibronectine dans la lame basale sur la migration des CEIs cryptales. Signalons en terminant qu'un rôle analogue de l'ILK est rapporté dans le contexte différent de l'épiderme murin. Dans ce cas, l'expression de l'ILK est importante afin d'empêcher le détachement des kératinocytes indifférenciés de la lame basale et leur localisation aberrante au niveau de la couche suprabasale (Lorenz et al., 2007).

Nous avons détecté les membres du complexe PIP au niveau de la membrane latérale des CEIs progénitrices des cryptes. Ainsi, à l'image de ce qui est rapporté chez les cultures primaires de kératinocytes, l'ILK et/ou le complexe PIP pourraient contribuer à la dynamique du recrutement initial des constituants des jonctions cellule-cellule — telles que la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine — chez les CEIs de la portion inférieure des cryptes. Évidemment, nos observations ne permettent pas de confirmer l'existence d'un tel rôle de l'ILK chez les CEIs. Toutefois, la population membranaire latérale des membres du complexe PIP dans les cryptes pourrait être impliquée dans le même type de fonctions et de mécanismes que ceux suggérés plus tôt concernant la détection de l'ILK à l'interface membranaire latérale des cellules Caco-2/15 (voir la section 4.2). Il serait également intéressant de vérifier lors de travaux ultérieurs si cette distribution particulière de l'ILK et de ses partenaires de l'hétérotrimère implique les interactions entre l'ILK et la protéine adaptatrice IQGAP1, puisque : 1) la présence de cette dernière dans les sites d'adhésion intercellulaire est cruciale pour le recrutement de la  $\beta$ -caténine et de la E-cadherine au niveau de ces sites (Abel et al., 2015; Noritake et al., 2005), 2) les interactions entre l'ILK et IQGAP1 dans le contexte de l'axe intégrine-microtubule sont importantes pour la polarisation basale-apicale et le transport (*trafficking*) des protéines membranaires chez d'autres types de cellules épithéliales (Akhtar and Streuli, 2013; Wickstrom et al., 2010a) et 3) la formation d'un complexe entre l'ILK et IQGAP1 chez les CEIs a précédemment été démontré dans le modèle cellulaire du CRC SW480 (Tang et al., 2011). Toutefois, sachant d'après nos résultats que l'expression du complexe PIP est inhibée chez les CEIs différenciées et que l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire demeure inchangée chez les cellules Caco-2/15 siILK. Cela suggère qu'à l'image de ce qui est rapporté chez les kératinocytes (Widmaier et al., 2012), ces fonctions possibles de l'ILK ne seraient ultimement pas nécessaires pour le processus de différenciation des CEIs *in vivo*.

À l'inverse, différentes indications provenant de la littérature et de nos résultats convergent pour suggérer que l'inhibition de l'expression du complexe PIP lors de la différenciation des



CEIs serait essentielle pour l'intégrité des caractères polarisés matures des CEIs différenciées. En effet, il est bien documenté que les effets mécanodépendants de l'adhésion des cellules épithéliales sur un substrat relativement rigide interfèrent avec l'élaboration et la contraction des faisceaux d'actine sous-apicaux de type *terminal web* servant à la formation des jonctions adhérentes (Drenckhahn and Dermietzel, 1988; Kim et al., 2010b). De plus, les effets stimulants de la fibronectine sur l'activité de RhoA sont rapportés pour antagoniser les fonctions de Rac1 et Cdc42 dans l'établissement des sites d'adhésion intercellulaire (Arthur et al., 2002). Enfin, il est typiquement considéré que contrairement à la laminine, la fibronectine est un substrat d'adhésion médiocre pour le maintien et l'intégrité du phénotype polarisé et différencié des CEIs (Hahn, 1988; Schreider et al., 2002; Wang et al., 2010). Ainsi, puisque nous montrons que les fonctions de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine augmentent l'adhésivité cellule-MEC des CEIs via l'assemblage de la fibronectine soluble en matrice fibrillaire. L'inhibition de l'expression du complexe PIP chez les CEIs progressant près de l'interface crypte-villosité est vraisemblablement déterminante pour l'intégrité du processus de différenciation terminale et des structures polarisées spécialisées chez les CEIs qui intègrent les villosités. Cette interprétation s'accorde d'ailleurs avec les effets opposés que nous avons proposés concernant la réexpression du complexe PIP lors de la dépolarisation/dédifférenciation de type EMT des CEIs impliquées dans le processus de restitution épithéliale des villosités intestinales.

Mentionnons pour terminer cette discussion que nos immunofluorescences de l'ILK, de PINCH-1 et des parvines confirment que ces protéines sont également exprimées chez les éléments cellulaires du mésenchyme de l'intestin fœtal et chez les myofibroblastes péricryptaux de l'intestin adulte. Or, une étude chez des fibroblastes murins en culture rapporte que les fonctions de l'ILK sont requises afin d'induire l'expression de la fibronectine en réponse au TGF- $\beta$ 1 (Vi et al., 2011), un processus qui est par ailleurs essentiel pour la transdifférenciation des cellules fibroblastiques du mésenchyme intestinal en myofibroblastes péricryptaux (Hinz, 2006; Mifflin et al., 2011). L'apport de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine serait donc déterminant dans la régulation du comportement et des fonctions cellulaires fondamentales chez d'autres types de cellules de la muqueuse intestinale.

## Conclusion et perspectives

De façon générale, mes recherches permettent une meilleure compréhension du rôle que joue l'ILK dans la régulation des interactions cellule-MEC, de même que des mécanismes contrôlant ces interactions chez les cellules épithéliales en conditions physiologiques normales. Mes recherches ont également permis de mettre en évidence que toutes études des fonctions de l'ILK devraient considérer les effets fibronectine-dépendants potentiels de l'ILK et du complexe PIP dans leurs hypothèses de travail de départ.

Plus spécifiquement, mes travaux de doctorat apportent plusieurs éléments complémentaires permettant de démontrer que l'ILK — de par son implication pour l'axe fonctionnel fibronectine-intégrine/PIP-actine — accomplit un rôle crucial pour les fonctions des CEIs régulées par les interactions cellule-MEC par les intégrines. De cette façon, l'expression de l'ILK contribue à la régulation des caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'axe MEC-intégrine-actine des CEIs. En fait, bien que certaines de mes données suggèrent également l'existence de fonctions plus subtiles de l'ILK chez les CEIs, dans tous les cas elles supportent que le rôle de l'ILK pour l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine soit le rôle déterminant de cette protéine chez les CEIs *in vivo* et *ex vivo*. Nous avons en outre démontré que l'expression du complexe PIP permet aux CEIs prolifératives d'assembler une matrice de fibronectine fibrillaire à partir de la forme compacte et soluble de cette protéine. Ainsi, la stabilisation du complexe PIP au niveau des sites d'adhésion cellule-MEC des CEIs constitue selon toute vraisemblance l'un des pivots permettant de contrôler les propriétés biochimiques et biomécaniques de la MEC. En ce sens, l'expression basolatérale de l'ILK et du complexe PIP qui est prépondérante chez les CEIs de la crypte intestinale humaine est selon toute vraisemblance cruciale afin de réguler les propriétés de la lame basale contribuant au contrôle des différents processus et comportements des CEIs qui sont requis pour l'homéostasie de la muqueuse intestinale — tels que principalement la prolifération, l'étalement/migration et la restitution cellulaire (cryptale et villositaire).

Sachant que : 1) l'expression anormalement élevée de la fibronectine, de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et de RhoA ont été démontré pour contribuer à la progression de la carcinogenèse du cancer du côlon et d'autres types de cancer (Inufusa et al., 1995; Jeong et al., 2016; Pelillo et al., 2015), 2) les effets mécanodépendants de la rigidité de la MEC stimulent la prolifération et la migration

des cellules cancéreuses (Tilghman et al., 2010), et 3) l'assemblage aberrant de la fibronectine a déjà été associé avec la formation des lésions fibreuses dans différentes physiopathologies telles que les maladies inflammatoires (Bonniaud et al., 2004; To and Midwood, 2011). La relation directe exceptionnelle que nous avons découverte entre l'expression de l'ILK et le processus de déposition/assemblage de la fibronectine chez les CEIs démontre que l'inhibition spécifique de l'ILK et de l'axe fibronectine-intégrine/PIP-actine constitue une approche à considérer sérieusement dans la recherche portant sur le traitement des physiopathologies intestinales telles que les maladies inflammatoires et le cancer.

La poursuite de ce projet devra en priorité permettre de déterminer la contribution l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (et/ou des autres récepteurs intégrines de la fibronectine) dans le rétablissement du processus de fibrillogénèse de la fibronectine et les effets de la fibronectine fibrillaire chez les cellules HIEC (siILK) en condition d'inhibition de l'expression de l'ILK. Puis, elle devra permettre d'établir clairement les mécanismes impliquant le complexe PIP et les intégrines dans le processus de fibrillogénèse de la fibronectine chez les CEIs (p. ex. est-ce que le recrutement de la kindline-2 par le complexe PIP dans les sites d'adhésion des intégrines est impliqué dans la régulation des interactions entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibronectine préfibrillaire chez les cellules HIEC?).

En résumé, mes recherches ont permis de caractériser l'expression et le rôle principal de l'ILK et du complexe PIP chez les CEIs *in vivo* et *ex vivo*. De plus, mes recherches ont permis d'identifier les fonctions cellulaires régulées par ce rôle chez les CEIs de l'épithélium intestinal humain sain.

## Remerciements

L'achèvement de cette thèse de doctorat a nécessité la participation et le soutien de plusieurs personnes envers lesquelles je tiens à exprimer ma reconnaissance.

Je veux d'abord remercier le directeur de mes travaux, le Pr Jean-François Beaulieu. Sincèrement merci de m'avoir guidé, soutenu et d'avoir cru en mes capacités tout au long de mon parcours de maîtrise et de doctorat. Merci pour ton exemple, tes judicieux conseils et infiniment merci de m'avoir fait confiance et permis de revenir terminer cette thèse.

Je tiens également à remercier le codirecteur de mes travaux, le Pr Pierre Vachon. Merci de m'avoir donné ma première chance en recherche et encouragé à poursuivre des études supérieures. Merci de m'avoir épaulé pendant ces nombreuses années et pour ton aide et tes précieux conseils scientifiques et didactiques lors de l'écriture de mon premier article.

Merci aux Pr Fernand-Pierre Gendron et Nathalie Fauchoux de l'Université de Sherbrooke et à la Dre Nathalie Lamarche-Vane de l'Université McGill d'avoir accepté d'être membres de mon jury et pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de cette thèse.

Je tiens à remercier mes collègues présents et passés. Particulièrement E(liz)abeth, Eric et Nuria pour votre aide, mais également tous mes confrères étudiants avec qui j'ai toujours eu beaucoup de plaisirs et dont plusieurs sont devenus de bons amis. Merci également aux personnels et aux membres du département de biologie cellulaire pour votre bon travail et votre collaboration et plus spécialement à Dominic Jean pour tes très nombreux conseils techniques en biologie et en informatique.

D'un point de vu plus personnel, je veux remercier chacun de mes amis de m'avoir encouragé durant ces nombreuses années d'études. Plus particulièrement à Jean-Phillipe, Roxanne, Jean-Pierre, Mélanie, Francis, Amy et enfin Vincent pour votre soutien inestimable et votre amitié sans réserve au cours des dernières années. Je m'en voudrais de passer sous silence la contribution spéciale de mes amis à quatre pattes : Bündock, Tia <`^ ), Rosie, Gucci et enfin (mais non le moindre...) Saku. Merci de m'avoir assisté (p. ex. en ronflant à côté de moi durant

mes longues heures de lectures et d'écritures...), amusé (qui amusait qui?) et réconforté chacun à votre manière et en votre temps.

Un gros merci aux membres des grandes familles Dionne et Gagné pour votre intérêt envers mes travaux d'études et vos encouragements. Spécialement à mes parrains et marraines Bobby et Liz pour votre soutien et à ma grand-mère Mammy qui aurait été si fière de me voir obtenir ce diplôme.

Merci de tout mon cœur à ma très chère petite sœur Marylène. Je tiens particulièrement à te remercier de t'être occupé de ton grand frère quand il en avait le plus besoin!

Enfin, je veux dédier cette thèse et exprimer toute ma reconnaissance à mes parents. Serge et Francine. Par-dessus tout merci de m'avoir encouragé et soutenu inconditionnellement, sans vous rien de tout cela n'aurait été possible.

## Références

- Abel, A.M., K.M. Schuldt, K. Rajasekaran, D. Hwang, M.J. Riese, S. Rao, M.S. Thakar, and S. Malarkannan. 2015. IQGAP1: insights into the function of a molecular puppeteer. *Mol Immunol.* 65:336-349.
- Acconcia, F., C.J. Barnes, R.R. Singh, A.H. Talukder, and R. Kumar. 2007. Phosphorylation-dependent regulation of nuclear localization and functions of integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6782-6787.
- Ahmed, D., P.W. Eide, I.A. Eilertsen, S.A. Danielsen, M. Eknaes, M. Hektoen, G.E. Lind, and R.A. Lothe. 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2:e71.
- Aittaleb, M., C.A. Boguth, and J.J. Tesmer. 2010. Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol.* 77:111-125.
- Akhtar, N., and C.H. Streuli. 2013. An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol.* 15:17-27.
- Alberti, C. 2009. Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 13:13-21.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271:20246-20249.
- Apodaca, G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic.* 2:149-159.
- Arthur, W.T., N.K. Noren, and K. Burridge. 2002. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res.* 35:239-246.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719-722.
- Askari, J.A., P.A. Buckley, A.P. Mould, and M.J. Humphries. 2009. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.* 122:165-170.
- Assi, K., J. Mills, D. Owen, C. Ong, R. St Arnaud, S. Dedhar, and B. Salh. 2008. Integrin-linked kinase regulates cell proliferation and tumour growth in murine colitis-associated carcinogenesis. *Gut.* 57:931-940.
- Assi, K., S. Patterson, S. Dedhar, D. Owen, M. Levings, and B. Salh. 2011. Role of Epithelial Integrin-Linked Kinase in Promoting Intestinal Inflammation: Effects on CCL2, Fibronectin and the T Cell Repertoire. *BMC Immunology.* 12:42.
- Attwell, S., J. Mills, A. Troussard, C. Wu, and S. Dedhar. 2003. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell.* 14:4813-4825.
- Babbin, B.A., S. Koch, M. Bachar, M.A. Conti, C.A. Parkos, R.S. Adelstein, A. Nusrat, and A.I. Ivanov. 2009. Non-muscle myosin IIA differentially regulates intestinal epithelial cell restitution and matrix invasion. *Am J Pathol.* 174:436-448.

- Baneyx, G., L. Baugh, and V. Vogel. 2001. Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14464-14468.
- Baneyx, G., L. Baugh, and V. Vogel. 2002. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:5139-5143.
- Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*. 339:269-280.
- Barden, J.A., M. Miki, B.D. Hambly, and C.G. Dos Remedios. 1987. Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur J Biochem*. 162:583-588.
- Barker, T.H., G. Baneyx, M. Cardo-Vila, G.A. Workman, M. Weaver, P.M. Menon, S. Dedhar, S.A. Rempel, W. Arap, R. Pasqualini, V. Vogel, and E.H. Sage. 2005. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem*. 280:36483-36493.
- Basora, N., M.P. Tetreault, M.P. Boucher, E. Herring, and J.F. Beaulieu. 2010. Polycystin-1 is a microtubule-driven desmosome-associated component in polarized epithelial cells. *Exp Cell Res*. 316:1454-1464.
- Basora, N., P.H. Vachon, F.E. Herring-Gillam, N. Perreault, and J.F. Beaulieu. 1997. Relation between integrin  $\alpha 7 \beta 1$  expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology*. 113:1510-1521.
- Basson, M.D. 2001. In vitro evidence for matrix regulation of intestinal epithelial biology during mucosal healing. *Life Sci*. 69:3005-3018.
- Basson, M.D., Z. Rashid, G.A. Turowski, A.B. West, N.J. Emenaker, S.A. Sgambati, F. Hong, D.M. Perdakis, S. Datta, and J.A. Madri. 1996. Restitution at the cellular level: regulation of the migrating phenotype. *Yale J Biol Med*. 69:119-129.
- Beaulieu, J.F. 1992. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci*. 102 ( Pt 3):427-436.
- Beaulieu, J.F. 1997. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem*. 31:1-78.
- Beaulieu, J.F. 2010. Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 1:3-11.
- Beaulieu, J.F., and A. Quaroni. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J*. 280 ( Pt 3):599-608.
- Beausejour, M., D. Noel, S. Thibodeau, V. Bouchard, C. Harnois, J.F. Beaulieu, M.J. Demers, and P.H. Vachon. 2012. Integrin/Fak/Src-mediated regulation of cell survival and anoikis in human intestinal epithelial crypt cells: selective engagement and roles of PI3-K isoform complexes. *Apoptosis*. 17:566-578.
- Beausejour, M., S. Thibodeau, M.J. Demers, V. Bouchard, R. Gauthier, J.F. Beaulieu, and P.H. Vachon. 2013. Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha 3 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ , and  $\alpha 6 \beta 4$  integrins. *BMC Cell Biol*. 14:53.
- Bellissent-Waydelich, A., M.T. Vanier, C. Albiges-Rizo, and P. Simon-Assmann. 1999. Talin concentrates to the midbody region during mammalian cell cytokinesis. *J Histochem Cytochem*. 47:1357-1368.

- Benoit, Y.D., J.F. Groulx, D. Gagne, and J.F. Beaulieu. 2012. RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *J Signal Transduct.* 2012:248759.
- Benoit, Y.D., J.F. Larrivee, J.F. Groulx, J. Stankova, P.H. Vachon, and J.F. Beaulieu. 2010. Integrin  $\alpha 8 \beta 1$  confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 399:434-439.
- Benoit, Y.D., C. Lussier, P.A. Ducharme, S. Sivret, L.M. Schnapp, N. Basora, and J.F. Beaulieu. 2009. Integrin  $\alpha 8 \beta 1$  regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell.* 101:695-708.
- Boettiger, D., and B. Wehrle-Haller. 2010. Integrin and glycocalyx mediated contributions to cell adhesion identified by single cell force spectroscopy. *J Phys Condens Matter.* 22:194101.
- Bonniaud, P., M. Kolb, T. Galt, J. Robertson, C. Robbins, M. Stampfli, C. Lavery, P.J. Margetts, A.B. Roberts, and J. Gauldie. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 173:2099-2108.
- Bottcher, R.T., A. Lange, and R. Fassler. 2009. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 21:670-675.
- Bouchard, V., M.J. Demers, S. Thibodeau, V. Laquerre, N. Fujita, T. Tsuruo, J.F. Beaulieu, R. Gauthier, A. Vezina, L. Villeneuve, and P.H. Vachon. 2007. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol.* 212:717-728.
- Bouchard, V., C. Harnois, M.J. Demers, S. Thibodeau, V. Laquerre, R. Gauthier, A. Vezina, D. Noel, N. Fujita, T. Tsuruo, M. Arguin, and P.H. Vachon. 2008. B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis.* 13:531-542.
- Boudeau, J., D. Miranda-Saavedra, G.J. Barton, and D.R. Alessi. 2006. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol.* 16:443-452.
- Boudjadi, S., J.C. Carrier, and J.F. Beaulieu. 2013. Integrin  $\alpha 1$  subunit is up-regulated in colorectal cancer *Biomarker Research.* 1:16:1-7.
- Boulter, E., D. Grall, S. Cagnol, and E. Van Obberghen-Schilling. 2006. Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. *FASEB J.* 20:1489-1491.
- Boulter, E., and E. Van Obberghen-Schilling. 2006. Integrin-linked kinase and its partners: a modular platform regulating cell-matrix adhesion dynamics and cytoskeletal organization. *Eur J Cell Biol.* 85:255-263.
- Braun, A., R. Bordoy, F. Stanchi, M. Moser, G.G. Kostka, E. Ehler, O. Brandau, and R. Fassler. 2003. PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions. *Exp Cell Res.* 284:239-250.
- Bravou, V., G. Klironomos, E. Papadaki, D. Stefanou, and J. Varakis. 2003. Integrin-linked kinase (ILK) expression in human colon cancer. *Br J Cancer.* 89:2340-2341.



- Bravou, V., G. Klironomos, E. Papadaki, S. Taraviras, and J. Varakis. 2006. ILK over-expression in human colon cancer progression correlates with activation of beta-catenin, down-regulation of E-cadherin and activation of the Akt-FKHR pathway. *J Pathol.* 208:91-99.
- Buchler, N.E., U. Gerland, and T. Hwa. 2005. Nonlinear protein degradation and the function of genetic circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9559-9564.
- Burridge, K., and E.S. Wittchen. 2013. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.* 200:9-19.
- Burrows, L., K. Clark, A.P. Mould, and M.J. Humphries. 1999. Fine mapping of inhibitory anti-alpha5 monoclonal antibody epitopes that differentially affect integrin-ligand binding. *Biochem J.* 344 Pt 2:527-533.
- Buske, P., J. Przybilla, M. Loeffler, N. Sachs, T. Sato, H. Clevers, and J. Galle. 2012. On the biomechanics of stem cell niche formation in the gut--modelling growing organoids. *FEBS J.* 279:3475-3487.
- Byron, A., J.D. Humphries, J.A. Askari, S.E. Craig, A.P. Mould, and M.J. Humphries. 2009. Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 122:4009-4011.
- Cabodi, S., M. del Pilar Camacho-Leal, P. Di Stefano, and P. Defilippi. 2010. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer.* 10:858-870.
- Cai, G., J. Lian, S.S. Shapiro, and D.A. Beacham. 2000. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. *Methods Cell Sci.* 22:107-114.
- Camacho-Leal, P., A.B. Zhai, and C.P. Stanners. 2007. A co-clustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *J Cell Physiol.* 211:791-802.
- Campbell, I.D., and M.J. Humphries. 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:237-251.
- Cargnello, M., and P.P. Roux. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75:50-83.
- Carman, C.V., and T.A. Springer. 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol.* 15:547-556.
- Carraher, C.L., and J.E. Schwarzbauer. 2013. Regulation of matrix assembly through rigidity-dependent fibronectin conformational changes. *J Biol Chem.* 288:14805-14814.
- Caswell, P.T., S. Vadrevu, and J.C. Norman. 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:843-853.
- Cavalcanti-Adam, E.A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J.* 92:2964-2974.
- Chan, K.T., D.A. Bennis, and A. Huttenlocher. 2010. Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem.* 285:11418-11426.
- Chang, C.W., and S. Kumar. 2015. Differential Contributions of Nonmuscle Myosin II Isoforms and Functional Domains to Stress Fiber Mechanics. *Sci Rep.* 5:13736.

- Chang, L., and R.D. Goldman. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:601-613.
- Chen, X., Z. Li, Z. Feng, J. Wang, C. Ouyang, W. Liu, B. Fu, G. Cai, C. Wu, R. Wei, D. Wu, and Q. Hong. 2006. Integrin-linked kinase induces both senescence-associated alterations and extracellular fibronectin assembly in aging cardiac fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 61:1232-1245.
- Cherfils, J., and M. Zeghouf. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 93:269-309.
- Chiswell, B.P., A.L. Stiegler, Z. Razinia, E. Nalibotski, T.J. Boggon, and D.A. Calderwood. 2010. Structural basis of competition between PINCH1 and PINCH2 for binding to the ankyrin repeat domain of integrin-linked kinase. *J Struct Biol.* 170:157-163.
- Clark, K., R. Pankov, M.A. Travis, J.A. Askari, A.P. Mould, S.E. Craig, P. Newham, K.M. Yamada, and M.J. Humphries. 2005. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J Cell Sci.* 118:291-300.
- Clarke, D.M., M.C. Brown, D.P. LaLonde, and C.E. Turner. 2004. Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. *J Cell Biol.* 166:901-912.
- Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 154:274-284.
- Coconnier, M.H., M.F. Bernet-Camard, and A.L. Servin. 1994. How intestinal epithelial cell differentiation inhibits the cell-entry of *Yersinia pseudotuberculosis* in colon carcinoma Caco-2 cell line in culture. *Differentiation.* 58:87-94.
- Coghlan, M.P., A.A. Culbert, D.A. Cross, S.L. Corcoran, J.W. Yates, N.J. Pearce, O.L. Rausch, G.J. Murphy, P.S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M.J. Brown, D. Haigh, R.W. Ward, D.G. Smith, K.J. Murray, A.D. Reith, and J.C. Holder. 2000. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol.* 7:793-803.
- Coleman, M.L., E.A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar, and M.F. Olson. 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 3:339-345.
- Collins, C., and W.J. Nelson. 2015. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 36:62-70.
- Cordes, N. 2004. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res.* 64:5683-5692.
- Cortez, V., B.C. Nair, D. Chakravarty, and R.K. Vadlamudi. 2011. Integrin-linked kinase 1: role in hormonal cancer progression. *Front Biosci (Schol Ed).* 3:788-796.
- Croft, D.R., and M.F. Olson. 2006. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 26:4612-4627.
- Cseh, B., S. Fernandez-Sauze, D. Grall, S. Schaub, E. Doma, and E. Van Obberghen-Schilling. 2010. Autocrine fibronectin directs matrix assembly and crosstalk between cell-matrix and cell-cell adhesion in vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 123:3989-3999.

- Curnis, F., R. Longhi, L. Crippa, A. Cattaneo, E. Dondossola, A. Bachi, and A. Corti. 2006. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin. *J Biol Chem.* 281:36466-36476.
- Dagnino, L. 2011. Integrin-linked kinase: a Scaffold protein unique among its ilk. *J Cell Commun Signal.* 5:81-83.
- Danen, E.H., S. Aota, A.A. van Kraats, K.M. Yamada, D.J. Ruiter, and G.N. van Muijen. 1995. Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin alpha 5 beta 1. *J Biol Chem.* 270:21612-21618.
- Danen, E.H., P. Sonneveld, C. Brakebusch, R. Fassler, and A. Sonnenberg. 2002. The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 159:1071-1086.
- Danen, E.H., and K.M. Yamada. 2001. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol.* 189:1-13.
- de Beer, A.G., E.A. Cavalcanti-Adam, G. Majer, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2010. Force-induced destabilization of focal adhesions at defined integrin spacings on nanostructured surfaces. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 81:051914.
- De Matteis, G., A. Graudenzi, and M. Antoniotti. 2013. A review of spatial computational models for multi-cellular systems, with regard to intestinal crypts and colorectal cancer development. *J Math Biol.* 66:1409-1462.
- DeGeer, J., and N. Lamarche-Vane. 2013. Rho GTPases in neurodegeneration diseases. *Exp Cell Res.* 319:2384-2394.
- Deguchi, S., and M. Sato. 2009. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells. *Biorheology.* 46:93-105.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science.* 323:638-641.
- Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11211-11216.
- Delevoye, C., and B. Goud. 2015. Rab GTPases and kinesin motors in endosomal trafficking. *Methods Cell Biol.* 130:235-246.
- Deng, J.T., C. Sutherland, D.L. Brautigan, M. Eto, and M.P. Walsh. 2002. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J.* 367:517-524.
- Djelloul, S., M.E. Forgue-Lafitte, B. Hermelin, M. Mareel, E. Bruyneel, A. Baldi, A. Giordano, E. Chastre, and C. Gespach. 1997. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Lett.* 406:234-242.
- Dobrev, I., A. Fielding, L.J. Foster, and S. Dedhar. 2008. Mapping the integrin-linked kinase interactome using SILAC. *J Proteome Res.* 7:1740-1749.

- Dobreva, I., G. Waeber, R.W. James, and C. Widmann. 2006. Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure. *J Biol Chem.* 281:199-205.
- Drenckhahn, D., and R. Dermietzel. 1988. Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J Cell Biol.* 107:1037-1048.
- Dubin-Thaler, B.J., G. Giannone, H.G. Dobereiner, and M.P. Sheetz. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys J.* 86:1794-1806.
- Dubin-Thaler, B.J., J.M. Hofman, Y. Cai, H. Xenias, I. Spielman, A.V. Shneidman, L.A. David, H.G. Dobereiner, C.H. Wiggins, and M.P. Sheetz. 2008. Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. *PLoS One.* 3:e3735.
- Dydensborg, A.B., E. Herring, J. Auclair, E. Tremblay, and J.F. Beaulieu. 2006. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290:G1067-1074.
- East, J.A., S.P. Langdon, K.M. Townsend, and J.A. Hickman. 1992. The influence of type I collagen on the growth and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line HT-29 in vitro. *Differentiation.* 50:179-188.
- Eke, I., S. Hehlhans, and N. Cordes. 2009. There's something about ILK. *Int J Radiat Biol.* 85:929-936.
- Eke, I., V. Sandfort, A. Mischkus, M. Baumann, and N. Cordes. 2006. Antiproliferative effects of EGFR tyrosine kinase inhibition and radiation-induced genotoxic injury are attenuated by adhesion to fibronectin. *Radiother Oncol.* 80:178-184.
- Engler, A.J., M. Chan, D. Boettiger, and J.E. Schwarzbauer. 2009. A novel mode of cell detachment from fibrillar fibronectin matrix under shear. *J Cell Sci.* 122:1647-1653.
- Erat, M.C., D.A. Slatter, E.D. Lowe, C.J. Millard, R.W. Farndale, I.D. Campbell, and I. Vakonakis. 2009. Identification and structural analysis of type I collagen sites in complex with fibronectin fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:4195-4200.
- Escaffit, F., F. Boudreau, and J.F. Beaulieu. 2005a. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol.* 203:15-26.
- Escaffit, F., F. Pare, R. Gauthier, N. Rivard, F. Boudreau, and J.F. Beaulieu. 2006. Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 342:66-72.
- Escaffit, F., N. Perreault, D. Jean, C. Francoeur, E. Herring, C. Rancourt, N. Rivard, P.H. Vachon, F. Pare, M.P. Boucher, J. Auclair, and J.F. Beaulieu. 2005b. Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res.* 302:206-220.
- Esfandiarei, M., S.A. Yazdi, V. Gray, S. Dedhar, and C. van Breemen. 2010. Integrin-linked kinase functions as a downstream signal of platelet-derived growth factor to regulate actin polymerization and vascular smooth muscle cell migration. *BMC Cell Biol.* 11:16.

- Essler, M., M. Amano, H.J. Kruse, K. Kaibuchi, P.C. Weber, and M. Aepfelbacher. 1998. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:21867-21874.
- Faucheux, N., R. Tzoneva, M.D. Nagel, and T. Groth. 2006. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials.* 27:234-245.
- Fielding, A.B., I. Dobрева, and S. Dedhar. 2008a. Beyond focal adhesions: integrin-linked kinase associates with tubulin and regulates mitotic spindle organization. *Cell Cycle.* 7:1899-1906.
- Fielding, A.B., I. Dobрева, P.C. McDonald, L.J. Foster, and S. Dedhar. 2008b. Integrin-linked kinase localizes to the centrosome and regulates mitotic spindle organization. *J Cell Biol.* 180:681-689.
- Fielding, A.B., S. Lim, K. Montgomery, I. Dobрева, and S. Dedhar. 2011. A critical role of integrin-linked kinase, ch-TOG and TACC3 in centrosome clustering in cancer cells. *Oncogene.* 30:521-534.
- Franco, S.J., M.A. Rodgers, B.J. Perrin, J. Han, D.A. Bennin, D.R. Critchley, and A. Huttenlocher. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol.* 6:977-983.
- Frey, M.R., A. Golovin, and D.B. Polk. 2004. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *J Biol Chem.* 279:44513-44521.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 188:11-19.
- Friedland, J.C., M.H. Lee, and D. Boettiger. 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science.* 323:642-644.
- Fuchs, B.C., T. Fujii, J.D. Dorfman, J.M. Goodwin, A.X. Zhu, M. Lanuti, and K.K. Tanabe. 2008. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 68:2391-2399.
- Fukuda, K., K. Bledzka, J. Yang, H.D. Perera, E.F. Plow, and J. Qin. 2014. Molecular basis of kindlin-2 binding to integrin-linked kinase pseudokinase for regulating cell adhesion. *J Biol Chem.* 289:28363-28375.
- Fukuda, K., S. Gupta, K. Chen, C. Wu, and J. Qin. 2009. The pseudoactive site of ILK is essential for its binding to alpha-Parvin and localization to focal adhesions. *Mol Cell.* 36:819-830.
- Fukuda, K., J.D. Knight, G. Piszczek, R. Kothary, and J. Qin. 2011. Biochemical, Proteomic, Structural, and Thermodynamic Characterizations of Integrin-linked Kinase (ILK): CROSS-VALIDATION OF THE PSEUDOKINASE. *J Biol Chem.* 286:21886-21895.
- Fukuda, T., K. Chen, X. Shi, and C. Wu. 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem.* 278:51324-51333.
- Gagne, D., J.F. Groulx, Y.D. Benoit, N. Basora, E. Herring, P.H. Vachon, and J.F. Beaulieu. 2010. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 222:387-400.

- Gahmberg, C.G., S.C. Fagerholm, S.M. Nurmi, T. Chavakis, S. Marchesan, and M. Gronholm. 2009. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*. 1790:431-444.
- Gallo, R.L., and L.V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*. 12:503-516.
- Garcia, A.J., and D. Boettiger. 1999. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling. *Biomaterials*. 20:2427-2433.
- Garcia, A.J., P. Ducheyne, and D. Boettiger. 1998a. Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res*. 40:48-56.
- Garcia, A.J., F. Huber, and D. Boettiger. 1998b. Force required to break alpha5beta1 integrin-fibronectin bonds in intact adherent cells is sensitive to integrin activation state. *J Biol Chem*. 273:10988-10993.
- Garcia, A.J., J.E. Schwarzbauer, and D. Boettiger. 2002. Distinct activation states of alpha5beta1 integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry*. 41:9063-9069.
- Garcia, A.J., J. Takagi, and D. Boettiger. 1998c. Two-stage activation for alpha5beta1 integrin binding to surface-adsorbed fibronectin. *J Biol Chem*. 273:34710-34715.
- Garcia, A.J., M.D. Vega, and D. Boettiger. 1999. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell*. 10:785-798.
- Gardel, M.L., I.C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C.M. Waterman. 2010. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Gasparski, A.N., and K.A. Beningo. 2015. Mechanoreception at the cell membrane: More than the integrins. *Arch Biochem Biophys*. 586:20-26.
- Gayer, C.P., and M.D. Basson. 2009. The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cell Signal*. 21:1237-1244.
- Gee, E.P., D.E. Ingber, and C.M. Stultz. 2008. Fibronectin unfolding revisited: modeling cell traction-mediated unfolding of the tenth type-III repeat. *PLoS One*. 3:e2373.
- Gee, E.P., D. Yuksel, C.M. Stultz, and D.E. Ingber. 2013. SLLISWD Sequence in the 10FNIII Domain Initiates Fibronectin Fibrillogenesis. *J Biol Chem*.
- Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:21-33.
- Geiger, B., and K.M. Yamada. 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3.
- Geiger, T., and R. Zaidel-Bar. 2012. Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome. *Curr Opin Cell Biol*. 24:562-568.
- Ghatak, S., J. Morgner, and S.A. Wickstrom. 2013. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage. *Biochem Soc Trans*. 41:995-1001.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, H.G. Dobereiner, N. Kieffer, A.R. Bresnick, and M.P. Sheetz. 2004. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*. 116:431-443.
- Giepmans, B.N., and S.C. van Ijzendoorn. 2009. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta*. 1788:820-831.

- Gil, D., D. Ciolczyk-Wierzbicka, J. Dulinska-Litewka, K. Zwawa, J.A. McCubrey, and P. Laidler. 2011. The mechanism of contribution of integrin linked kinase (ILK) to epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Adv Enzyme Regul.* 51:195-207.
- Gilcrease, M.Z. 2007. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* 247:1-25.
- Ginsberg, M.H. 2014. Integrin activation. *BMB Rep.* 47:655-659.
- Glukhova, M.A., and J.P. Thiery. 1993. Fibronectin and integrins in development. *Semin Cancer Biol.* 4:241-249.
- Gong, J., D. Wang, L. Sun, E. Zborowska, J.K. Willson, and M.G. Brattain. 1997. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 8:83-90.
- Gonzalez-Nieves, R., A.I. Desantis, and M.L. Cutler. 2013. Rsl1 contributes to regulation of cell adhesion and spreading by PINCH1-dependent and - independent mechanisms. *J Cell Commun Signal.*
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 12:63-71.
- Gout, S.P., M.R. Jacquier-Sarlin, L. Rouard-Talbot, P. Rousselle, and M.R. Block. 2001. RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 12:3268-3281.
- Graness, A., K. Giehl, and M. Goppelt-Struebe. 2006. Differential involvement of the integrin-linked kinase (ILK) in RhoA-dependent rearrangement of F-actin fibers and induction of connective tissue growth factor (CTGF). *Cell Signal.* 18:433-440.
- Grashoff, C., A. Aszodi, T. Sakai, E.B. Hunziker, and R. Fassler. 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep.* 4:432-438.
- Grinnell, F., and M.K. Feld. 1982. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem.* 257:4888-4893.
- Groulx, J.F., D. Gagne, Y.D. Benoit, D. Martel, N. Basora, and J.F. Beaulieu. 2011. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol.*
- Gu, F., C.M. Crump, and G. Thomas. 2001. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci.* 58:1067-1084.
- Gudzenko, T., and C.M. Franz. 2015. Studying early stages of fibronectin fibrillogenesis in living cells by atomic force microscopy. *Mol Biol Cell.* 26:3190-3204.
- Guebel, D.V., U. Schmitz, O. Wolkenhauer, and J. Vera. 2012. Analysis of cell adhesion during early stages of colon cancer based on an extended multi-valued logic approach. *Mol Biosyst.* 8:1230-1242.
- Guezguez, A., F. Pare, Y.D. Benoit, N. Basora, and J.F. Beaulieu. 2014. Modulation of stemness in a human normal intestinal epithelial crypt cell line by activation of the WNT signaling pathway. *Exp Cell Res.* 322:355-364.
- Guo, L., and C. Wu. 2002. Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex. *Faseb J.* 16:1298-1300.
- Hahn, U. 1988. Extracellular matrix proteins in small-intestinal cell cultures. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 151:70-78.

- Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33:891-895.
- Hamuro, M., J. Polan, M. Natarajan, and S. Mohan. 2002. High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration. *Atherosclerosis.* 162:277-287.
- Hannigan, G., A.A. Troussard, and S. Dedhar. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer.* 5:51-63.
- Hannigan, G.E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M.G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J.C. Bell, and S. Dedhar. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379:91-96.
- Hannigan, G.E., P.C. McDonald, M.P. Walsh, and S. Dedhar. 2011. Integrin-linked kinase: not so 'pseudo' after all. *Oncogene.* 30:4375-4385.
- Hao, J., Y. Zhang, Y. Wang, R. Ye, J. Qiu, Z. Zhao, and J. Li. 2014. Role of extracellular matrix and YAP/TAZ in cell fate determination. *Cell Signal.* 26:186-191.
- Harnois, C., M.J. Demers, V. Bouchard, K. Vallee, D. Gagne, N. Fujita, T. Tsuruo, A. Vezina, J.F. Beaulieu, A. Cote, and P.H. Vachon. 2004. Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol.* 198:209-222.
- Hayman, E.G., M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, and E. Ruoslahti. 1985. Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Cell Res.* 160:245-258.
- Hayman, E.G., and E. Ruoslahti. 1979. Distribution of fetal bovine serum fibronectin and endogenous rat cell fibronectin in extracellular matrix. *J Cell Biol.* 83:255-259.
- Heath, J.P. 1996. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int.* 20:139-146.
- Heng, Y.W., and C.G. Koh. 2010. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:1622-1633.
- Hinkson, I.V., and J.E. Elias. 2011. The dynamic state of protein turnover: It's about time. *Trends Cell Biol.* 21:293-303.
- Ho, E., T. Irvine, G.J. Vilk, G. Lajoie, K.S. Ravichandran, S.J. D'Souza, and L. Dagnino. 2009. Integrin-linked kinase interactions with ELMO2 modulate cell polarity. *Mol Biol Cell.* 20:3033-3043.
- Hocking, D.C., J. Sottile, and K.J. Langenbach. 2000. Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization. *J Biol Chem.* 275:10673-10682.
- Holmes, R., and R.W. Lobley. 1989. Intestinal brush border revisited. *Gut.* 30:1667-1678.
- Honda, S., H. Shirotani-Ikejima, S. Tadokoro, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. Tomiyama, and T. Miyata. 2009. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood.* 113:5304-5313.
- Horton, E.R., A. Byron, J.A. Askari, D.H. Ng, A. Millon-Fremillon, J. Robertson, E.J. Koper, N.R. Paul, S. Warwood, D. Knight, J.D. Humphries, and M.J. Humphries. 2015. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol.* 17:1577-1587.



- Huang, H.C., C.H. Hu, M.C. Tang, W.S. Wang, P.M. Chen, and Y. Su. 2007. Thymosin beta4 triggers an epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma by upregulating integrin-linked kinase. *Oncogene*. 26:2781-2790.
- Huang, J., S. Mahavadi, W. Sriwai, W. Hu, and K.S. Murthy. 2006. Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J*. 396:193-200.
- Huet-Calderwood, C., N.N. Brahme, N. Kumar, A.L. Stiegler, S. Raghavan, T.J. Boggon, and D.A. Calderwood. 2014. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J Cell Sci*. 127:4308-4321.
- Huot, J., F. Houle, S. Rousseau, R.G. Deschesnes, G.M. Shah, and J. Landry. 1998. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 143:1361-1373.
- Huveneers, S., and E.H. Danen. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 122:1059-1069.
- Huveneers, S., H. Truong, R. Fassler, A. Sonnenberg, and E.H. Danen. 2008. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J Cell Sci*. 121:2452-2462.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673-687.
- Hynes, R.O., and A. Naba. 2012. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a004903.
- Hytonen, V.P., and B. Wehrle-Haller. 2015. Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res*.
- Ilyas, M., I.P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli, and W.F. Bodmer. 1997. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10330-10334.
- Inufusa, H., M. Nakamura, T. Adachi, Y. Nakatani, K. Shindo, M. Yasutomi, and H. Matsuura. 1995. Localization of oncofetal and normal fibronectin in colorectal cancer. Correlation with histologic grade, liver metastasis, and prognosis. *Cancer*. 75:2802-2808.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:247-269.
- Janmey, P.A., R.G. Wells, R.K. Assoian, and C.A. McCulloch. 2013. From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation*. 86:112-120.
- Jensen, L.T., and N.B. Host. 1997. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc Res*. 33:535-539.
- Jeong, D., S. Park, H. Kim, C.J. Kim, T.S. Ahn, S.B. Bae, H.J. Kim, T.H. Kim, J. Im, M.S. Lee, H.Y. Kwon, and M.J. Baek. 2016. RhoA is associated with invasion and poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 48:714-722.
- Johnson, K.J., H. Sage, G. Briscoe, and H.P. Erickson. 1999. The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem*. 274:15473-15479.

- Judah, D., A. Rudkouskaya, R. Wilson, D.E. Carter, and L. Dagnino. 2012. Multiple roles of integrin-linked kinase in epidermal development, maturation and pigmentation revealed by molecular profiling. *PLoS One*. 7:e36704.
- Julich, D., A.P. Mould, E. Koper, and S.A. Holley. 2009. Control of extracellular matrix assembly along tissue boundaries via Integrin and Eph/Ephrin signaling. *Development*. 136:2913-2921.
- Jung, K.Y., K. Chen, M. Kretzler, and C. Wu. 2007. TGF-beta1 regulates the PINCH-1-integrin-linked kinase-alpha-parvin complex in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol*. 18:66-73.
- Kadler, K.E., A. Hill, and E.G. Canty-Laird. 2008. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol*. 20:495-501.
- Kassianidou, E., and S. Kumar. 2015. A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1853:3065-3074.
- Katoh, H., K. Hiramoto, and M. Negishi. 2006. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci*. 119:56-65.
- Katoh, H., and M. Negishi. 2003. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature*. 424:461-464.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi, and K. Fujiwara. 2001. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*. 153:569-584.
- Katoh, K., Y. Kano, and Y. Noda. 2010. Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J R Soc Interface*.
- Katsumi, A., J. Milanini, W.B. Kiosses, M.A. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol*. 158:153-164.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 11:1047-1060.
- Kawano, Y., Y. Fukata, N. Oshiro, M. Amano, T. Nakamura, M. Ito, F. Matsumura, M. Inagaki, and K. Kaibuchi. 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*. 147:1023-1038.
- Keselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. Garcia. 2003. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 66:247-259.
- Khan, W.I., and J.E. Ghia. 2010. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol*. 161:19-27.
- Khyrul, W.A., D.P. LaLonde, M.C. Brown, H. Levinson, and C.E. Turner. 2004. The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. 279:54131-54139.
- Kim, J.H., and A.R. Asthagiri. 2011. Matrix stiffening sensitizes epithelial cells to EGF and enables the loss of contact inhibition of proliferation. *J Cell Sci*. 124:1280-1287.
- Kim, J.H., L.J. Dooling, and A.R. Asthagiri. 2010a. Intercellular mechanotransduction during multicellular morphodynamics. *J R Soc Interface*. 7 Suppl 3:S341-350.

- Kim, M., M. Ogawa, Y. Fujita, Y. Yoshikawa, T. Nagai, T. Koyama, S. Nagai, A. Lange, R. Fassler, and C. Sasakawa. 2009. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature*. 459:578-582.
- Kim, M., M. Ogawa, H. Mimuro, and C. Sasakawa. 2010b. Reinforcement of epithelial cell adhesion to basement membrane by a bacterial pathogen as a new infectious stratagem. *Virulence*. 1:52-55.
- Kim, Y.B., S. Choi, M.C. Choi, M.A. Oh, S.A. Lee, M. Cho, K. Mizuno, S.H. Kim, and J.W. Lee. 2008. Cell adhesion-dependent cofilin serine 3 phosphorylation by the integrin-linked kinase.c-Src complex. *J Biol Chem*. 283:10089-10096.
- Kiss, E., A. Muranyi, C. Csontos, P. Gergely, M. Ito, D.J. Hartshorne, and F. Erdodi. 2002. Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J*. 365:79-87.
- Klemke, R.L., S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D.A. Cheresh. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*. 137:481-492.
- Knaus, U.G., A. Bamberg, and G.M. Bokoch. 2007. Rac and Rap GTPase activation assays. *Methods Mol Biol*. 412:59-67.
- Kogata, N., R.M. Tribe, R. Fassler, M. Way, and R.H. Adams. 2009. Integrin-linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/ROCK-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Genes Dev*. 23:2278-2283.
- Kong, F., A.J. Garcia, A.P. Mould, M.J. Humphries, and C. Zhu. 2009. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J Cell Biol*. 185:1275-1284.
- Korenbaum, E., T.M. Olski, and A.A. Noegel. 2001. Genomic organization and expression profile of the parvin family of focal adhesion proteins in mice and humans. *Gene*. 279:69-79.
- Korinek, V., N. Barker, K. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree, and H. Clevers. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol*. 18:1248-1256.
- Kornblihtt, A.R., C.G. Pesce, C.R. Alonso, P. Cramer, A. Srebrow, S. Werbajh, and A.F. Muro. 1996. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J*. 10:248-257.
- Kosako, H., T. Yoshida, F. Matsumura, T. Ishizaki, S. Narumiya, and M. Inagaki. 2000. Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*. 19:6059-6064.
- Kovalevich, J., B. Tracy, and D. Langford. 2011. PINCH: More than just an adaptor protein in cellular response. *J Cell Physiol*. 226:940-947.
- Koyama, M., M. Ito, J. Feng, T. Seko, K. Shiraki, K. Takase, D.J. Hartshorne, and T. Nakano. 2000. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*. 475:197-200.
- Kruegel, J., and N. Miosge. 2010. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci*. 67:2879-2895.
- Kuwada, S.K., and X. Li. 2000. Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Mol Biol Cell*. 11:2485-2496.

- LaLonde, D.P., M.C. Brown, B.P. Bouverat, and C.E. Turner. 2005. Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem.* 280:21680-21688.
- LaLonde, D.P., M. Grubinger, N. Lamarche-Vane, and C.E. Turner. 2006. CdGAP associates with actopaxin to regulate integrin-dependent changes in cell morphology and motility. *Curr Biol.* 16:1375-1385.
- Lange, A., S.A. Wickstrom, M. Jakobson, R. Zent, K. Sainio, and R. Fassler. 2009. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature.* 461:1002-1006.
- Larjava, H., J. Peltonen, S.K. Akiyama, S.S. Yamada, H.R. Gralnick, J. Uitto, and K.M. Yamada. 1990. Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 110:803-815.
- Laukaitis, C.M., D.J. Webb, K. Donais, and A.F. Horwitz. 2001. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol.* 153:1427-1440.
- Laurie, G.W., C.P. Leblond, and G.R. Martin. 1982. Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol.* 95:340-344.
- Lawson, C.D., and K. Burridge. 2014. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases.* 5:e27958.
- Lee, J.W., and R.L. Juliano. 2002. The alpha5beta1 integrin selectively enhances epidermal growth factor signaling to the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1542:23-31.
- Lefort, C.T., K. Wojciechowski, and D.C. Hocking. 2011. N-cadherin cell-cell adhesion complexes are regulated by fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem.* 286:3149-3160.
- Legate, K.R., and R. Fassler. 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci.* 122:187-198.
- Legate, K.R., E. Montanez, O. Kudlacek, and R. Fassler. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:20-31.
- Legate, K.R., S.A. Wickstrom, and R. Fassler. 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23:397-418.
- Leiss, M., K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, and R. Fassler. 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 20:502-507.
- Lessey, E.C., C. Guilluy, and K. Burridge. 2012. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry.* 51:7420-7432.
- Leusch, H.G., S.A. Hefta, Z. Drzeniek, K. Hummel, Z. Markos-Pusztai, and C. Wagener. 1990. Escherichia coli of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett.* 261:405-409.
- Levy, F., N. Johnsson, T. Rumenapf, and A. Varshavsky. 1996. Using ubiquitin to follow the metabolic fate of a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:4907-4912.
- Levy, P., H. Robin, M. Kornprobst, J. Capeau, and G. Cherqui. 1998. Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J Cell Physiol.* 177:618-627.

- Li, R., B. Liu, H. Yin, W. Sun, J. Yin, and Q. Su. 2012. Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) is associated with tumor progression and an unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. *J Mol Histol*.
- Li, Y., X. Tan, C. Dai, D.B. Stolz, D. Wang, and Y. Liu. 2009. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 20:1907-1918.
- Lim, S., E. Kawamura, A.B. Fielding, M. Maydan, and S. Dedhar. 2013. Integrin-linked kinase regulates interphase and mitotic microtubule dynamics. *PLoS One*. 8:e53702.
- Lin, X., H. Qadota, D.G. Moerman, and B.D. Williams. 2003. C. elegans PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo. *Curr Biol*. 13:922-932.
- Liu, P., J. Lu, W.V. Cardoso, and C. Vaziri. 2008. The SPARC-related factor SMOC-2 promotes growth factor-induced cyclin D1 expression and DNA synthesis via integrin-linked kinase. *Mol Biol Cell*. 19:248-261.
- Lock, J.G., B. Wehrle-Haller, and S. Stromblad. 2008. Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol*. 18:65-76.
- Lorentz, O., I. Duluc, A.D. Arcangelis, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, and J.N. Freund. 1997. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol*. 139:1553-1565.
- Lorenz, K., C. Grashoff, R. Torka, T. Sakai, L. Langbein, W. Bloch, M. Aumailley, and R. Fassler. 2007. Integrin-linked kinase is required for epidermal and hair follicle morphogenesis. *J Cell Biol*. 177:501-513.
- Lorenz, S., I. Vakonakis, E.D. Lowe, I.D. Campbell, M.E. Noble, and M.K. Hoellerer. 2008. Structural analysis of the interactions between paxillin LD motifs and alpha-parvin. *Structure*. 16:1521-1531.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 25:619-647.
- Lussier, C., N. Basora, Y. Bouatrous, and J.F. Beaulieu. 2000. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech*. 51:169-178.
- Lutz, R., K. Pataky, N. Gadhari, M. Marelli, J. Brugger, and M. Chiquet. 2011. Nano-stenciled RGD-gold patterns that inhibit focal contact maturation induce lamellipodia formation in fibroblasts. *PLoS One*. 6:e25459.
- Lutz, R., T. Sakai, and M. Chiquet. 2010. Pericellular fibronectin is required for RhoA-dependent responses to cyclic strain in fibroblasts. *J Cell Sci*. 123:1511-1521.
- Ly, D.P., K.M. Zazzali, and S.A. Corbett. 2003. De novo expression of the integrin alpha5beta1 regulates alphavbeta3-mediated adhesion and migration on fibrinogen. *J Biol Chem*. 278:21878-21885.
- Lynch, D.K., C.A. Ellis, P.A. Edwards, and I.D. Hiles. 1999. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene*. 18:8024-8032.

- MacDonald, J.A., M.A. Borman, A. Muranyi, A.V. Somlyo, D.J. Hartshorne, and T.A. Haystead. 2001. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:2419-2424.
- Mackinnon, A.C., H. Qadota, K.R. Norman, D.G. Moerman, and B.D. Williams. 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol*. 12:787-797.
- Macklis, J.D., R.L. Sidman, and H.D. Shine. 1985. Cross-linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol*. 21:189-194.
- Maheshwari, G., G. Brown, D.A. Lauffenburger, A. Wells, and L.G. Griffith. 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 10):1677-1686.
- Maier, S., R. Lutz, L. Gelman, A. Sarasa-Renedo, S. Schenk, C. Grashoff, and M. Chiquet. 2008. Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1783:1150-1162.
- Mainali, D., and E.A. Smith. 2013. Select cytoplasmic and membrane proteins increase the percentage of immobile integrins but do not affect the average diffusion coefficient of mobile integrins. *Anal Bioanal Chem*.
- Mammen, J.M., and J.B. Matthews. 2003. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med*. 31:S532-537.
- Mammoto, T., and D.E. Ingber. 2010. Mechanical control of tissue and organ development. *Development*. 137:1407-1420.
- Margadant, C., and A. Sonnenberg. 2010. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*. 11:97-105.
- Margueron, R., and D. Reinberg. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 469:343-349.
- Marieb, E.N. 1993. Anatomie et Physiologie Humaines. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., St-Laurent, Qc.
- Marotta, A., K. Parhar, D. Owen, S. Dedhar, and B. Salh. 2003. Characterisation of integrin-linked kinase signalling in sporadic human colon cancer. *Br J Cancer*. 88:1755-1762.
- Marotta, A., C. Tan, V. Gray, S. Malik, S. Gallinger, J. Sanghera, B. Dupuis, D. Owen, S. Dedhar, and B. Salh. 2001. Dysregulation of integrin-linked kinase (ILK) signaling in colonic polyposis. *Oncogene*. 20:6250-6257.
- Maurer, L.M., B.R. Tomasini-Johansson, and D.F. Mosher. 2010. Emerging roles of fibronectin in thrombosis. *Thromb Res*. 125:287-291.
- Mavria, G., Y. Vercoulen, M. Yeo, H. Paterson, M. Karasarides, R. Marais, D. Bird, and C.J. Marshall. 2006. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell*. 9:33-44.
- Maydan, M., P.C. McDonald, J. Sanghera, J. Yan, C. Rallis, S. Pinchin, G.E. Hannigan, L.J. Foster, D. Ish-Horowicz, M.P. Walsh, and S. Dedhar. 2010. Integrin-linked kinase is a functional Mn<sup>2+</sup>-dependent protein kinase that regulates glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) phosphorylation. *PLoS One*. 5:e12356.
- McDonald, P.C., A.B. Fielding, and S. Dedhar. 2008. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci*. 121:3121-3132.

- Medema, J.P., and L. Vermeulen. 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 474:318-326.
- Meineke, F.A., C.S. Potten, and M. Loeffler. 2001. Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Prolif*. 34:253-266.
- Ménard, D., J.F. Beaulieu, F. Boudreau, N. Perreault, N. Rivard, and P.H. Vachon. 2005. Chapter20 -Gastrointestinal Tract. *Cell Signaling and Growth Factors in Development: From Molecules to Organogenesis*; . 1:755-790.
- Meyer, A., C.M. van Golen, M. Boyanapalli, B. Kim, M.E. Soules, and E.L. Feldman. 2005. Integrin-linked kinase complexes with caveolin-1 in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*. 44:932-938.
- Mifflin, R.C., I.V. Pinchuk, J.I. Saada, and D.W. Powell. 2011. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300:G684-696.
- Montanez, E., S. Ussar, M. Schifferer, M. Bosl, R. Zent, M. Moser, and R. Fassler. 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev*. 22:1325-1330.
- Moore, S.W., P. Roca-Cusachs, and M.P. Sheetz. 2010. Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell*. 19:194-206.
- Moretti, F.A., A.K. Chauhan, A. Iaconcig, F. Porro, F.E. Baralle, and A.F. Muro. 2007. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem*. 282:28057-28062.
- Morgan, M.R., A. Byron, M.J. Humphries, and M.D. Bass. 2009. Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life*. 61:731-738.
- Morgan, T.E., and G.L. Huber. 1967. Loss of lipid during fixation for electron microscopy. *J Cell Biol*. 32:757-760.
- Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 275:1787-1790.
- Morse, E.M., N.N. Brahme, and D.A. Calderwood. 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*. 53:810-820.
- Moser, M., K.R. Legate, R. Zent, and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*. 324:895-899.
- Mould, A.P., J.A. Askari, S. Aota, K.M. Yamada, A. Irie, Y. Takada, H.J. Mardon, and M.J. Humphries. 1997. Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. *J Biol Chem*. 272:17283-17292.
- Mould, A.P., and M.J. Humphries. 2004. Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr Opin Cell Biol*. 16:544-551.
- Murali, A., and K. Rajalingam. 2014. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cell Mol Life Sci*. 71:1703-1721.
- Muranyi, A., J.A. MacDonald, J.T. Deng, D.P. Wilson, T.A. Haystead, M.P. Walsh, F. Erdodi, E. Kiss, Y. Wu, and D.J. Hartshorne. 2002. Phosphorylation of the

- myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J.* 366:211-216.
- Nakrieko, K.A., A. Vespa, D. Mason, T.S. Irvine, S.J. D'Souza, and L. Dagnino. 2008a. Modulation of integrin-linked kinase nucleo-cytoplasmic shuttling by ILKAP and CRM1. *Cell Cycle.* 7:2157-2166.
- Nakrieko, K.A., I. Welch, H. Dupuis, D. Bryce, A. Pajak, R. St Arnaud, S. Dedhar, S.J. D'Souza, and L. Dagnino. 2008b. Impaired hair follicle morphogenesis and polarized keratinocyte movement upon conditional inactivation of integrin-linked kinase in the epidermis. *Mol Biol Cell.* 19:1462-1473.
- Naumanen, P., P. Lappalainen, and P. Hotulainen. 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc.* 231:446-454.
- New, D.C., and Y.H. Wong. 2007. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal.* 2:2.
- Ni, H., A.B. Dydensborg, F.E. Herring, N. Basora, D. Gagne, P.H. Vachon, and J.F. Beaulieu. 2005. Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression. *Oncogene.* 24:6820-6829.
- Nikolopoulos, S.N., and C.E. Turner. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem.* 276:23499-23505.
- Nikolopoulos, S.N., and C.E. Turner. 2002. Molecular dissection of actopaxin-integrin-linked kinase-Paxillin interactions and their role in subcellular localization. *J Biol Chem.* 277:1568-1575.
- Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci.* 118:2085-2092.
- Norman, K.R., S. Cordes, H. Qadota, P. Rahmani, and D.G. Moerman. 2007. UNC-97/PINCH is involved in the assembly of integrin cell adhesion complexes in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *Dev Biol.* 309:45-55.
- Novak, A., S.C. Hsu, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, J. Papkoff, R. Montesano, C. Roskelley, R. Grosschedl, and S. Dedhar. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4374-4379.
- Ogawa, Y., M.H. Kim, and M. Kino-Oka. 2015. Changes in human mesenchymal stem cell behaviors on dendrimer-immobilized surfaces due to mediation of fibronectin adsorption and assembly. *J Biosci Bioeng.*
- Ohashi, T., and H.P. Erickson. 2009. Revisiting the mystery of fibronectin multimers: the fibronectin matrix is composed of fibronectin dimers cross-linked by non-covalent bonds. *Matrix Biol.* 28:170-175.
- Ohashi, T., and H.P. Erickson. 2011. Fibronectin aggregation and assembly: the unfolding of the second fibronectin type III domain. *J Biol Chem.* 286:39188-39199.
- Ohashi, T., D.P. Kiehart, and H.P. Erickson. 2002. Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *J Cell Sci.* 115:1221-1229.
- Oloumi, A., M. Maidan, F.E. Lock, H. Tearle, S. McKinney, W.J. Muller, S.A. Aparicio, and S. Dedhar. 2010. Cooperative signaling between Wnt1 and integrin-linked kinase induces accelerated breast tumor development. *Breast Cancer Res.* 12:R38.



- Oloumi, A., T. McPhee, and S. Dedhar. 2004. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1691:1-15.
- Oloumi, A., S. Syam, and S. Dedhar. 2006. Modulation of Wnt3a-mediated nuclear beta-catenin accumulation and activation by integrin-linked kinase in mammalian cells. *Oncogene*. 25:7747-7757.
- Oneyama, C., E. Morii, D. Okuzaki, Y. Takahashi, J. Ikeda, N. Wakabayashi, H. Akamatsu, M. Tsujimoto, T. Nishida, K. Aozasa, and M. Okada. 2012. MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene*. 31:1623-1635.
- Pageot, L.P., N. Perreault, N. Basora, C. Francoeur, P. Magny, and J.F. Beaulieu. 2000. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech*. 49:394-406.
- Pankov, R., E. Cukierman, B.Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K.M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*. 148:1075-1090.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:633-643.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:185-194.
- Pasapera, A.M., S.V. Plotnikov, R.S. Fischer, L.B. Case, T.T. Egelhoff, and C.M. Waterman. 2015. Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol*. 25:175-186.
- Pasquet, J.M., M. Noury, and A.T. Nurden. 2002. Evidence that the platelet integrin alphaIIb beta3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway. *Thromb Haemost*. 88:115-122.
- Patla, I., T. Volberg, N. Elad, V. Hirschfeld-Warneken, C. Grashoff, R. Fassler, J.P. Spatz, B. Geiger, and O. Medalia. 2010. Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nat Cell Biol*. 12:909-915.
- Pawlak, G., and D.M. Helfman. 2002. Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 13:336-347.
- Pelillo, C., A. Bergamo, H. Mollica, M. Bestagno, and G. Sava. 2015. Colorectal Cancer Metastases Settle in the Hepatic Microenvironment Through alpha5beta1 Integrin. *J Cell Biochem*. 116:2385-2396.
- Pereira, J.A., Y. Benninger, R. Baumann, A.F. Goncalves, M. Ozcelik, T. Thurnherr, N. Tricaud, D. Meijer, R. Fassler, U. Suter, and J.B. Relvas. 2009. Integrin-linked kinase is required for radial sorting of axons and Schwann cell remyelination in the peripheral nervous system. *J Cell Biol*. 185:147-161.
- Perez, V.A., Z. Ali, T.P. Alastalo, F. Ikeno, H. Sawada, Y.J. Lai, T. Kleisli, E. Spiekerkoetter, X. Qu, L.H. Rubinos, E. Ashley, M. Amieva, S. Dedhar, and M. Rabinovitch. 2011. BMP promotes motility and represses growth of smooth muscle cells by activation of tandem Wnt pathways. *J Cell Biol*. 192:171-188.

- Perreault, N., and J.F. Beaulieu. 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res.* 224:354-364.
- Perreault, N., and J.F. Beaulieu. 1998. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 245:34-42.
- Persad, S., S. Attwell, V. Gray, N. Mawji, J.T. Deng, D. Leung, J. Yan, J. Sanghera, M.P. Walsh, and S. Dedhar. 2001. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem.* 276:27462-27469.
- Persengiev, S.P., X. Zhu, and M.R. Green. 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10:12-18.
- Peterson, L.J., Z. Rajfur, A.S. Maddox, C.D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey, and K. Burridge. 2004. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Mol Biol Cell.* 15:3497-3508.
- Petrie, R.J., A.D. Doyle, and K.M. Yamada. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:538-549.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Pichon, S., M. Bryckaert, and E. Berrou. 2004. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 117:2569-2577.
- Pignatelli, J., S.E. LaLonde, D.P. LaLonde, D. Clarke, and C.E. Turner. 2012. Actopaxin (alpha-parvin) phosphorylation is required for matrix degradation and cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 287:37309-37320.
- Pinon, P., J. Parssinen, P. Vazquez, M. Bachmann, R. Rahikainen, M.C. Jacquier, L. Azizi, J.A. Maatta, M. Bastmeyer, V.P. Hytonen, and B. Wehrle-Haller. 2014. Talin-bound NPLY motif recruits integrin-signaling adapters to regulate cell spreading and mechanosensing. *J Cell Biol.* 205:265-281.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 326:1208-1212.
- Poperechnaya, A., O. Varlamova, P.J. Lin, J.T. Stull, and A.R. Bresnick. 2000. Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle. *J Cell Biol.* 151:697-708.
- Postel, R., P. Vakeel, J. Topczewski, R. Knoll, and J. Bakkers. 2008. Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev Biol.* 318:92-101.
- Potten, C.S., C. Booth, and D.M. Pritchard. 1997. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol.* 78:219-243.
- Potten, C.S., R. Gandara, Y.R. Mahida, M. Loeffler, and N.A. Wright. 2009. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif.* 42:731-750.
- Powell, D.W., I.V. Pinchuk, J.I. Saada, X. Chen, and R.C. Mifflin. 2011. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol.* 73:213-237.
- Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2011. Fibroblast polarization is a matrix-

- rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol.* 13:1457-1465.
- Provenzano, P.P., and P.J. Keely. 2011. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *J Cell Sci.* 124:1195-1205.
- Qin, J., and C. Wu. 2012. ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 24:607-613.
- Qu, H., Y. Tu, X. Shi, H. Larjava, M.A. Saleem, S.J. Shattil, K. Fukuda, J. Qin, M. Kretzler, and C. Wu. 2011. Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins. *J Cell Sci.* 124:879-891.
- Quaroni, A., K.J. Isselbacher, and E. Ruoslahti. 1978. Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:5548-5552.
- Radeva, G., T. Petrocelli, E. Behrend, C. Leung-Hagesteijn, J. Filmus, J. Slingerland, and S. Dedhar. 1997. Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem.* 272:13937-13944.
- Radovanac, K., J. Morgner, J.N. Schulz, K. Blumbach, C. Patterson, T. Geiger, M. Mann, T. Krieg, B. Eckes, R. Fassler, and S.A. Wickstrom. 2013. Stabilization of integrin-linked kinase by the Hsp90-CHIP axis impacts cellular force generation, migration and the fibrotic response. *EMBO J.* 32:1409-1424.
- Rajakulendran, T., and F. Sicheri. 2010. Allosteric protein kinase regulation by pseudokinases: insights from STRAD. *Sci Signal.* 3:pe8.
- Rankin, C.R., R.S. Hilgarth, G. Leoni, M. Kwon, K.A. Den Beste, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2013. Annexin A2 regulates beta1 integrin internalization and intestinal epithelial cell migration. *J Biol Chem.*
- Reinhart-King, C.A. 2011. How matrix properties control the self-assembly and maintenance of tissues. *Ann Biomed Eng.* 39:1849-1856.
- Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18:578-585.
- Roca-Cusachs, P., N.C. Gauthier, A. Del Rio, and M.P. Sheetz. 2009. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:16245-16250.
- Rodriguez-Boulan, E., and W.J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* 245:718-725.
- Rognoni, E., R. Ruppert, and R. Fassler. 2016. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci.* 129:17-27.
- Roovers, K., and R.K. Assoian. 2006. Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G1 phase cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 26:5203.
- Rosano, L., F. Spinella, V. Di Castro, S. Dedhar, M.R. Nicotra, P.G. Natali, and A. Bagnato. 2006. Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 5:833-842.

- Rosenberger, G., I. Jantke, A. Gal, and K. Kutsche. 2003. Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet.* 12:155-167.
- Roy, D.C., and D.C. Hocking. 2013. Recombinant fibronectin matrix mimetics specify integrin adhesion and extracellular matrix assembly. *Tissue Eng Part A.* 19:558-570.
- Ryan, P.L., R.A. Foty, J. Kohn, and M.S. Steinberg. 2001. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4323-4327.
- Sakai, T., M. Larsen, and K.M. Yamada. 2003a. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature.* 423:876-881.
- Sakai, T., S. Li, D. Docheva, C. Grashoff, K. Sakai, G. Kostka, A. Braun, A. Pfeifer, P.D. Yurchenco, and R. Fassler. 2003b. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev.* 17:926-940.
- Salsmann, A., E. Schaffner-Reckinger, and N. Kieffer. 2006. RGD, the Rho'd to cell spreading. *Eur J Cell Biol.* 85:249-254.
- Saltel, F., E. Mortier, V.P. Hytonen, M.C. Jacquier, P. Zimmermann, V. Vogel, W. Liu, and B. Wehrle-Haller. 2009. New PI(4,5)P2- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control beta3-integrin clustering. *J Cell Biol.* 187:715-731.
- Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers. 2004. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:695-723.
- Sanders, L.C., F. Matsumura, G.M. Bokoch, and P. de Lanerolle. 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science.* 283:2083-2085.
- Sandfort, V., I. Eke, and N. Cordes. 2010. The role of the focal adhesion protein PINCH1 for the radiosensitivity of adhesion and suspension cell cultures. *PLoS One.* 5.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell.* 127:1015-1026.
- Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem.* 10:245-256.
- Schmidt, D.R., and W.J. Kao. 2007. Monocyte activation in response to polyethylene glycol hydrogels grafted with RGD and PHSRN separated by interpositional spacers of various lengths. *J Biomed Mater Res A.* 83:617-625.
- Schmidt, S., and P. Friedl. 2010. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 339:83-92.
- Schotman, H., L. Karhinen, and C. Rabouille. 2009. Integrins mediate their unconventional, mechanical-stress-induced secretion via RhoA and PINCH in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 122:2662-2672.
- Schreider, C., G. Peignon, S. Thenet, J. Chambaz, and M. Pincon-Raymond. 2002. Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. *J Cell Sci.* 115:543-552.
- Schwartz, M. 2004. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci.* 117:5457-5458.
- Schwartz, M.A. 2010. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a005066.

- Schwarz, U.S., and M.L. Gardel. 2012. United we stand: integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *J Cell Sci.* 125:3051-3060.
- Schwarzbauer, J.E., and D.W. DeSimone. 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Scott, L.E., D.B. Mair, J.D. Narang, K. Feleke, and C.A. Lemmon. 2015. Fibronectin fibrillogenesis facilitates mechano-dependent cell spreading, force generation, and nuclear size in human embryonic fibroblasts. *Integr Biol (Camb).* 7:1454-1465.
- Sebe-Pedros, A., A.J. Roger, F.B. Lang, N. King, and I. Ruiz-Trillo. 2010. Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:10142-10147.
- Sechler, J.L., S.A. Corbett, and J.E. Schwarzbauer. 1997. Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. *Mol Biol Cell.* 8:2563-2573.
- Seltana, A., N. Basora, and J.F. Beaulieu. 2010. Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen.* 18:114-122.
- Sepulveda, J.L., and C. Wu. 2006. The parvins. *Cell Mol Life Sci.* 63:25-35.
- Serrano, I., P.C. McDonald, F.E. Lock, and S. Dedhar. 2013. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGFbeta-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene.* 32:50-60.
- Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* 28:815-820.
- Shi, F., and J. Sottile. 2008. Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J Cell Sci.* 121:2360-2371.
- Shi, Q., and D. Boettiger. 2003. A novel mode for integrin-mediated signaling: tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Mol Biol Cell.* 14:4306-4315.
- Shi, X., H. Qu, M. Kretzler, and C. Wu. 2008. Roles of PINCH-2 in regulation of glomerular cell shape change and fibronectin matrix deposition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F253-263.
- Shibue, T., M.W. Brooks, and R.A. Weinberg. 2013. An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell.* 24:481-498.
- Shimizu, M. 2010. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74:232-241.
- Simon-Assmann, P., M. Kedinger, and K. Haffen. 1986. Immunocytochemical localization of extracellular-matrix proteins in relation to rat intestinal morphogenesis. *Differentiation.* 32:59-66.
- Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer. 2010. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.*
- Sjoblom, B., J. Ylanne, and K. Djinoovic-Carugo. 2008. Novel structural insights into F-actin-binding and novel functions of calponin homology domains. *Curr Opin Struct Biol.* 18:702-708.
- Smith, H.W., and C.J. Marshall. 2010. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:23-36.

- Somasiri, A., A. Howarth, D. Goswami, S. Dedhar, and C.D. Roskelley. 2001. Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells. *J Cell Sci.* 114:1125-1136.
- Sottile, J., and D.C. Hocking. 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 13:3546-3559.
- Sottile, J., D.C. Hocking, and K.J. Langenbach. 2000. Fibronectin polymerization stimulates cell growth by RGD-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci.* 113 Pt 23:4287-4299.
- Sottile, J., D.C. Hocking, and P.J. Swiatek. 1998. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 19):2933-2943.
- Sottile, J., F. Shi, I. Rublyevska, H.Y. Chiang, J. Lust, and J. Chandler. 2007. Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1934-1946.
- Spitaleri, A., S. Mari, F. Curnis, C. Traversari, R. Longhi, C. Bordignon, A. Corti, G.P. Rizzardi, and G. Musco. 2008. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of alphavbeta3 integrin. *J Biol Chem.* 283:19757-19768.
- Stanchi, F., C. Grashoff, C.F. Nguemeni Yonga, D. Grall, R. Fassler, and E. Van Obberghen-Schilling. 2009. Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J Cell Sci.* 122:1800-1811.
- Stiegler, A.L., K.M. Draheim, X. Li, N.E. Chayen, D.A. Calderwood, and T.J. Boggon. 2012. Structural basis for paxillin binding and focal adhesion targeting of beta-parvin. *J Biol Chem.* 287:32566-32577.
- Streuli, C.H., and N. Akhtar. 2009. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J.* 418:491-506.
- Stutzmann, J., A. Bellissent-Waydelich, L. Fontao, J.F. Launay, and P. Simon-Assmann. 2000. Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech.* 51:179-190.
- Szczepanowska, J. 2009. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochim Pol.* 56:225-234.
- Takagi, J. 2004. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem Soc Trans.* 32:403-406.
- Takagi, J., K. Strokovich, T.A. Springer, and T. Walz. 2003. Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *EMBO J.* 22:4607-4615.
- Takahashi, S., M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann, A. Pfeifer, H. Kessler, J. Takagi, H.P. Erickson, and R. Fassler. 2007. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol.* 178:167-178.
- Tan, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A.G. de Herreros, and S. Dedhar. 2001. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene.* 20:133-140.
- Tang, M.C., L.C. Chan, Y.C. Yeh, C.Y. Chen, T.Y. Chou, W.S. Wang, and Y. Su. 2011. Thymosin beta 4 induces colon cancer cell migration and clinical metastasis via

- enhancing ILK/IQGAP1/Rac1 signal transduction pathway. *Cancer Lett.* 308:162-171.
- Teller, I.C., J. Auclair, E. Herring, R. Gauthier, D. Menard, and J.F. Beaulieu. 2007. Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev Dyn.* 236:1980-1990.
- Theocharis, A.D., S.S. Skandalis, C. Gialeli, and N.K. Karamanos. 2015. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.*
- Thomas, J.O., and R.D. Kornberg. 1975. An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:2626-2630.
- Tilghman, R.W., C.R. Cowan, J.D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J.K. Slack-Davis, B.R. Blackman, D.J. Tschumperlin, and J.T. Parsons. 2010. Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PLoS One.* 5:e12905.
- Tiwari, S., J.A. Askari, M.J. Humphries, and N.J. Bulleid. 2011. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *J Cell Sci.* 124:1672-1680.
- To, W.S., and K.S. Midwood. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 4:21.
- Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen. 2012. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci.* 125:1855-1864.
- Tomasini-Johansson, B.R., D.S. Annis, and D.F. Mosher. 2006. The N-terminal 70-kDa fragment of fibronectin binds to cell surface fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin. *Matrix Biol.* 25:282-293.
- Torres, M.A., and W.J. Nelson. 2000. Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *J Cell Biol.* 149:1433-1442.
- Totsukawa, G., Y. Wu, Y. Sasaki, D.J. Hartshorne, Y. Yamakita, S. Yamashiro, and F. Matsumura. 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol.* 164:427-439.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, S. Yamashiro, D.J. Hartshorne, Y. Sasaki, and F. Matsumura. 2000. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 150:797-806.
- Tremblay, E., J. Auclair, E. Delvin, E. Levy, D. Menard, A.V. Pshezhetsky, N. Rivard, E.G. Seidman, D. Sinnett, P.H. Vachon, and J.F. Beaulieu. 2006. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem.* 99:1175-1186.
- Troussard, A.A., C. Tan, T.N. Yoganathan, and S. Dedhar. 1999. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 19:7420-7427.
- Tsubouchi, S. 1983. Theoretical implications for cell migration through the crypt and the villus of labelling studies conducted at each position within the crypt. *Cell Tissue Kinet.* 16:441-456.
- Tucker, K.L., T. Sage, J.M. Stevens, P.A. Jordan, S. Jones, N.E. Barrett, R. St-Arnaud, J. Frampton, S. Dedhar, and J.M. Gibbins. 2008. A dual role for integrin-linked

- kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion. *Blood*. 112:4523-4531.
- Turner, H.L., and J.R. Turner. 2010. Good fences make good neighbors: Gastrointestinal mucosal structure. *Gut Microbes*. 1:22-29.
- Turner, J.R. 2006. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*. 169:1901-1909.
- Ueda, K., M. Murata-Hori, M. Tatsuka, and H. Hosoya. 2002. Rho-kinase contributes to diphosphorylation of myosin II regulatory light chain in nonmuscle cells. *Oncogene*. 21:5852-5860.
- Ussar, S., M. Moser, M. Widmaier, E. Rognoni, C. Harrer, O. Genzel-Boroviczeny, and R. Fassler. 2008. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet*. 4:e1000289.
- Vachon, P.H. 2011. Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *J Signal Transduct*. 2011:738137.
- Vachon, P.H., and J.F. Beaulieu. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*. 103:414-423.
- Vachon, P.H., J. Durand, and J.F. Beaulieu. 1993. Basement membrane formation and redistribution of the beta 1 integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat Rec*. 235:567-576.
- Vachon, P.H., A. Simoneau, F.E. Herring-Gillam, and J.F. Beaulieu. 1995. Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 216:30-34.
- Vakaloglou, K., and C. Zervas. 2012. Parvin-ILK: An intimate relationship. *Bioarchitecture*. 2:91-94.
- Vakonakis, I., D. Staunton, L.M. Rooney, and I.D. Campbell. 2007. Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *EMBO J*. 26:2575-2583.
- Valdembri, D., C. Sandri, M. Santambrogio, and G. Serini. 2011. Regulation of integrins by conformation and traffic: it takes two to tango. *Mol Biosyst*. 7:2539-2546.
- Vaynberg, J., T. Fukuda, K. Chen, O. Vinogradova, A. Velyvis, Y. Tu, L. Ng, C. Wu, and J. Qin. 2005. Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility. *Mol Cell*. 17:513-523.
- Velyvis, A., J. Vaynberg, Y. Yang, O. Vinogradova, Y. Zhang, C. Wu, and J. Qin. 2003. Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling. *Nat Struct Biol*. 10:558-564.
- Vespa, A., S.J. D'Souza, and L. Dagnino. 2005. A novel role for integrin-linked kinase in epithelial sheet morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 16:4084-4095.
- Vespa, A., A.J. Darmon, C.E. Turner, S.J. D'Souza, and L. Dagnino. 2003. Ca<sup>2+</sup>-dependent localization of integrin-linked kinase to cell junctions in differentiating keratinocytes. *J Biol Chem*. 278:11528-11535.
- Vigil, D., J. Cherfils, K.L. Rossman, and C.J. Der. 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 10:842-857.
- Vishnubhotla, R., S. Sun, J. Huq, M. Bulic, A. Ramesh, G. Guzman, M. Cho, and S.C. Glover. 2007. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2



- and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Invest.* 87:1149-1158.
- Volberg, T., L. Romer, E. Zamir, and B. Geiger. 2001. pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:2279-2289.
- Voth, D.E., and J.D. Ballard. 2005. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 18:247-263.
- Vouret-Craviari, V., E. Boulter, D. Grall, C. Matthews, and E. Van Obberghen-Schilling. 2004. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci.* 117:4559-4569.
- Walter, E., M.A. Croyle, B.J. Roessler, and G.L. Amidon. 1997. The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm Res.* 14:1216-1222.
- Wang, H.V., L.W. Chang, K. Brixius, S.A. Wickstrom, E. Montanez, I. Thievensen, M. Schwander, U. Muller, W. Bloch, U. Mayer, and R. Fassler. 2008a. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol.* 180:1037-1049.
- Wang, L., S.K. Murthy, G.A. Barabino, and R.L. Carrier. 2010. Synergic effects of crypt-like topography and ECM proteins on intestinal cell behavior in collagen based membranes. *Biomaterials.* 31:7586-7598.
- Wang, R., R.A. Clark, D.F. Mosher, and X.D. Ren. 2005. Fibronectin's central cell-binding domain supports focal adhesion formation and Rho signal transduction. *J Biol Chem.* 280:28803-28810.
- Wang, S., and M.D. Basson. 2009. Integrin-linked kinase: a multi-functional regulator modulating extracellular pressure-stimulated cancer cell adhesion through focal adhesion kinase and AKT. *Cell Oncol.* 31:273-289.
- Wang, X., K. Fukuda, I.J. Byeon, A. Velyvis, C. Wu, A. Gronenborn, and J. Qin. 2008b. The structure of alpha-parvin CH2-paxillin LD1 complex reveals a novel modular recognition for focal adhesion assembly. *J Biol Chem.* 283:21113-21119.
- Wang, Y., A. Reheman, C.M. Spring, J. Kalantari, A.H. Marshall, A.S. Wolberg, P.L. Gross, J.I. Weitz, M.L. Rand, D.F. Mosher, J. Freedman, and H. Ni. 2014. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *J Clin Invest.* 124:4281-4293.
- Wang, Y., G. Wang, X. Luo, J. Qiu, and C. Tang. 2011. Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells. *Burns.* 38:414-420.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6:154-161.
- Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone. 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci.* 124:1183-1193.
- White, L.R., J.B. Blanchette, L. Ren, A. Awn, K. Trpkov, and D.A. Muruve. 2007. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292:F567-576.
- Wickstrom, S.A., A. Lange, M.W. Hess, J. Polleux, J.P. Spatz, M. Kruger, K. Pfaller, A. Lambacher, W. Bloch, M. Mann, L.A. Huber, and R. Fassler. 2010a. Integrin-

- linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell*. 19:574-588.
- Wickstrom, S.A., A. Lange, E. Montanez, and R. Fassler. 2010b. The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *Embo J*. 29:281-291.
- Widmaier, M., E. Rognoni, K. Radovanac, S.B. Azimifar, and R. Fassler. 2012. Integrin-linked kinase at a glance. *J Cell Sci*. 125:1839-1843.
- Wierzbicka-Patynowski, I., Y. Mao, and J.E. Schwarzbauer. 2004. Analysis of fibronectin matrix assembly. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 10:Unit 10 12.
- Wierzbicka-Patynowski, I., and J.E. Schwarzbauer. 2002. Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem*. 277:19703-19708.
- Wierzbicka-Patynowski, I., and J.E. Schwarzbauer. 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 116:3269-3276.
- Winograd-Katz, S.E., R. Fassler, B. Geiger, and K.R. Legate. 2014. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15:273-288.
- Wong, S.Y., K.H. Chiam, C.T. Lim, and P. Matsudaira. 2010. Computational model of cell positioning: directed and collective migration in the intestinal crypt epithelium. *J R Soc Interface*. 7 Suppl 3:S351-363.
- Wormer, D., N.O. Deakin, and C.E. Turner. 2012. CdGAP regulates cell migration and adhesion dynamics in two-and three-dimensional matrix environments. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69:644-658.
- Worth, D.C., and M. Parsons. 2010. Advances in imaging cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 123:3629-3638.
- Wu, C., S.Y. Keightley, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, M. Coppolino, S. Goicoechea, J.A. McDonald, and S. Dedhar. 1998. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem*. 273:528-536.
- Xia, W., and T.A. Springer. 2014. Metal ion and ligand binding of integrin alpha5beta1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:17863-17868.
- Xie, W., F. Li, J.E. Kudlow, and C. Wu. 1998. Expression of the integrin-linked kinase (ILK) in mouse skin: loss of expression in suprabasal layers of the epidermis and up-regulation by erbB-2. *Am J Pathol*. 153:367-372.
- Xie, W., M. Zhao, W. Zhou, L. Guo, L. Huang, W. Yu, and X. Li. 2013. Targeting of integrin-linked kinase with small interfering RNA inhibits VEGF-induced angiogenesis in retinal endothelial cells. *Ophthalmic Res*. 49:139-149.
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2003. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood*. 102:1155-1159.
- Xiong, Y., P. Rangamani, M.A. Fardin, A. Lipshtat, B. Dubin-Thaler, O. Rossier, M.P. Sheetz, and R. Iyengar. 2010. Mechanisms controlling cell size and shape during isotropic cell spreading. *Biophys J*. 98:2136-2146.
- Xu, J., E. Bae, Q. Zhang, D.S. Annis, H.P. Erickson, and D.F. Mosher. 2009. Display of cell surface sites for fibronectin assembly is modulated by cell adherence to (1)F3 and C-terminal modules of fibronectin. *PLoS One*. 4:e4113.

- Xu, J., L.M. Maurer, B.R. Hoffmann, D.S. Annis, and D.F. Mosher. 2010. iso-DGR sequences do not mediate binding of fibronectin N-terminal modules to adherent fibronectin-null fibroblasts. *J Biol Chem.* 285:8563-8571.
- Yamaji, S., A. Suzuki, H. Kanamori, W. Mishima, R. Yoshimi, H. Takasaki, M. Takabayashi, K. Fujimaki, S. Fujisawa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. 2004. Affixin interacts with alpha-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J Cell Biol.* 165:539-551.
- Yang, J.T., and R.O. Hynes. 1996. Fibronectin receptor functions in embryonic cells deficient in alpha 5 beta 1 integrin can be replaced by alpha V integrins. *Mol Biol Cell.* 7:1737-1748.
- Yang, Y., L. Guo, S.M. Blattner, P. Mundel, M. Kretzler, and C. Wu. 2005. Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase-alpha-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. *J Am Soc Nephrol.* 16:1966-1976.
- Young, C.S., M. Kitamura, S. Hardy, and J. Kitajewski. 1998. Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 18:2474-2485.
- Yu, C.F., M.A. Sanders, and M.D. Basson. 2000. Human caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G952-966.
- Yuan, L., M.J. Fairchild, A.D. Perkins, and G. Tanentzapf. 2010. Analysis of integrin turnover in fly myotendinous junctions. *J Cell Sci.* 123:939-946.
- Yuan, L., M.A. Sanders, and M.D. Basson. 2011. ILK mediates the effects of strain on intestinal epithelial wound closure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300:C356-367.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 32:416-420.
- Zaidel-Bar, R., R. Milo, Z. Kam, and B. Geiger. 2007. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 120:137-148.
- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2:191-196.
- Zargham, R., B.R. Wamhoff, and G. Thibault. 2007. RNA interference targeting alpha8 integrin attenuates smooth muscle cell growth. *FEBS Lett.* 581:939-943.
- Zeisberg, M., and E.G. Neilson. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 119:1429-1437.
- Zemel, A., F. Rehfeldt, A.E. Brown, D.E. Discher, and S.A. Safran. 2010. Cell shape, spreading symmetry and the polarization of stress-fibers in cells. *J Phys Condens Matter.* 22:194110.
- Zervas, C.G., S.L. Gregory, and N.H. Brown. 2001. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 152:1007-1018.
- Zervas, C.G., E. Psarra, V. Williams, E. Solomon, K.M. Vakaloglou, and N.H. Brown. 2011. A central multifunctional role of integrin-linked kinase at muscle attachment sites. *J Cell Sci.* 124:1316-1327.

- Zhang, J., W. Li, M.A. Sanders, B.E. Sumpio, A. Panja, and M.D. Basson. 2003a. Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins. *Faseb J.* 17:926-928.
- Zhang, J., W. Li, B.E. Sumpio, and M.D. Basson. 2003b. Fibronectin blocks p38 and jnk activation by cyclic strain in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 306:746-749.
- Zhang, Q., W.J. Checovich, D.M. Peters, R.M. Albrecht, and D.F. Mosher. 1994. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol.* 127:1447-1459.
- Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch. 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 270:23934-23936.
- Zhang, Y., K. Chen, Y. Tu, A. Velyvis, Y. Yang, J. Qin, and C. Wu. 2002. Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J Cell Sci.* 115:4777-4786.
- Zhang, Y., K. Chen, Y. Tu, and C. Wu. 2004. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem.* 279:41695-41705.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A.M. Belkin, and K. Burridge. 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol.* 141:539-551.
- Zhu, J., and R.A. Clark. 2014. Fibronectin at select sites binds multiple growth factors and enhances their activity: expansion of the collaborative ECM-GF paradigm. *J Invest Dermatol.* 134:895-901.
- Zimmerman, B., T. Volberg, and B. Geiger. 2004. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58:143-159.